التكنولوجيا الحيوية وتربية النبات



سلسلة تربية النبات

التكنولوجيا الحيوية وتربية النبات

تطبيقات مزارع الأنسجة والهندسة الوراثية فى مجال الإنتاج الزراعى والتحسين الوراثى للنباتات

تأليف

أ.د. أحمد عبدالمنعم حسن

أستاذ تربية الخضر

كلية الزراعة – جامعة القاهرة

الطبعة الأولى

٢٠٠٧

حقوق النشر

سلسلة تربية النبات

التكنولوجيا الحيوية وتربية النبات

رقم الإيداع : ٢٠٠٦/٢٠٨٧١
I. S. B. N. : 977-258-237-6

للدار العربية للنشر والتوزيع
٣٢ شارع عباس العقاد – مدينة نصر
ت : ٢٧٥٣٣٣٥ فاكس : ٢٧٥٣٣٨٨

مقدمة الناشر

يتزايد الاهتمام باللغة العربية فى بلادنا يومًا بعد يوم .ولاشك أنه فى الغد لقريب ستستعيد اللغة العربية هيبتها التى طالما امتهنت وأذلت من أبنائها وغير أبنائها. ولا ريب فى أن امتهان لغة أية أمة من الأمم هو إذلال ثقافى فكرى للأمة نفسها؛ الأمر الذى يتطلب تضافر جهود أبناء الأمة رجالاً ونساءً، طلابًا وطالبات، علماء ومثقفين، مفكرين وسياسيين فى سبيل جعل لغة العروبة تحتل مكانتها اللائقة التى اعترف المجتمع الدولى بها لغة عمل فى منظمة الأمم المتحدة ومؤسساتها فى أنحاء العالم، لأنها لغة أمة ذات حضارة عريقة استوعبت - فيما مضى - علوم الأمم الأخرى. وصهرتها فى بوتقتها اللغوية والفكرية، فكانت لغة العلوم والأدب، ولغة الفكر والكتابة والمخاطبة.

إن الفضل فى التقدم العلمى الذى تنعم به أوروبا اليوم يرجع فى واقعه إلى الصحوة العلمية فى الترجمة التى عاشتها فى القرون الوسطى. فقد كان المرجع الوحيد للعلوم الطبية والعلمية والاجتماعية هو الكتب المترجمة عن اللغة العربية لابن سينا وابن الهيثم والفارابى وابن خلدون وغيرهم من عمالقة العرب، ولم ينكر الأوروبيون ذلك، بل يسجل تاريخهم ما ترجموه عن حضارة الفراعنة والعرب والإغريق. وهذا يشهد بأن اللغة العربية كانت مطواعة للعلم والتدريس والتأليف، وأنها قادرة على التعبير عن متطلبات الحياة وما يستجد من علوم، وأن غيرها ليس بأدق منها، ولا أقدر على التعبير.

ولكن ما أصاب الأمة من مصائب وجمود بدأ مع عصر الاستعمار التركى. ثم البريطانى والفرنسى، عاق اللغة عن النمو والتطور، وأبعدها عن العلم والحضارة، ولكن عندما أحس العرب بأن حياتهم لابد من أن تتغير. وأن جمودهم لابد أن تدب فيه الحياة. اندفع الرواد من اللغويين والأدباء، والعلماء فى إنماء اللغة وتطويرها، حتى أن مدرسة قصر العينى فى القاهرة. والجامعة الأمريكية فى بيروت درست الطب بالعربية أول إنشائها. ولو تصفحنا الكتب التى ألفت أو تُرجمت يوم كان الطب يدرس فيهما باللغة العربية لوجدناها كتبا ممتازة لا تقل جودة عن أمثلتها من كتب الغرب فى ذلك الحين، سواء فى الطبع، أو حسن التعبير، أو براعة الإيضاح، ولكن هذين المعهدين تنكرا للغة العربية فيما بعد، وسادت لغة المستعمر وفرضت على أبناء الأمة فرضا. إذ رأى المستعمر فى خنق اللغة العربية مجالاً لعرقلة الأمة العربية.

وبالرغم من المقاومة العنيفة التى قابلها، إلا أنه كان بين المواطنين صنائع سبقوا الأجنبى فيما يتطلع إليه، فتفننوا فى أساليب التملق له اكتسابًا لمرضاته، ورجال تأثروا بحملات المستعمر الظالمة، يشككون فى قدرة اللغة على استيعاب الحضارة الجديدة. وغاب عنهم ما قاله الحاكم الفرنسى لجيشه الزاحف إلى الجزائر. "علموا لغتنا وانشروها حتى نحكم الجزائر، فإذا حكمت لغتنا الجزائر، فقد حكمناها حقيقة"

فهل لى أن أوجه نداء إلى جميع حكومات الدول العربية بأن تبادر – فى أسرع وقت ممكن – إلى اتخاذ التدابير، والوسائل الكفيلة باستعمال اللغة العربية لغة تدريس فى جميع مراحل التعليم العام، والمهنى، والجامعى، مع العناية الكافية باللغات الأجنبية فى مختلف مراحل التعليم لتكون وسيلة الإطلاع على تطور العلم والثقافة والانفتاح على العالم وكلنا ثقة من إيمان العلماء والأساتذة بالتعريب، نظرًا لأن استعمال اللغة القومية فى التدريس ييسر على الطالب سرعة الفهم دون عائق لغوى، وبذلك تزداد حصيلته الدراسية، ويرتفع بمستواه العلمى، وذلك يعتبر تأصيلاً للفكر العلمى فى البلاد، وتمكينا للغة القومية من الازدهار والقيام بدورها فى التعبير عن حاجات المجتمع، وألفاظ ومصطلحات الحضارة والعلوم

ولا يغيب عن حكومتنا العربية أن حركة التعريب تسير متابطئة، أو تكاد تتوقف، بل تحارب أحيانًا ممن يشغلون بعض الوظائف القيادية فى سلك التعليم والجامعات، ممن ترك الإستعمار فى نفوسهم عقدًا وأمراضا. رغم أنهم يعلمون أن جامعات إسرائيل قد ترجمت العلوم إلى اللغة العبرية، وعدد من يتخاطب بها فى العالم لا يزيد عن خمسة عشر مليون يهوديًا، كما أنه من خلال زياراتى لبعض الدول واطلاعى وجدت كل أمة من الأمم تدرس بلغتها القومية مختلف فروع العلوم والآدب والتقنية، كاليابان، وإسبانيا، وألمانيا، ودول أمريكا اللاتينية، ولم تشك أمة من هذه الأمم فى قدرة لغتها على تغطية العلوم الحديثة، فهل أمة العرب أقل شأنا من غيرها ؟!

وأخيرًا وتمشيًا مع أهداف الدار العربية للنشر والتوزيع، وتحقيقا لأغراضها فى تدعيم الإنتاج العلمى، وتشجيع العلماء والباحثين فى إعادة مناهج التفكير العلمى وطرائقه إلى رحاب لغتنا الشريفة، تقوم الدار بنشر هذا الكتاب المتميز الذى يعتبر واحدا من ضمن ما نشرته – وستقوم بنشره – الدار من الكتب العربية التى قام بتأليفها أو ترجمتها نخبة ممتازة من أساتذة الجامعات المصرية والعربية المختلفة

وبهذا ننفذ عهدًا قطعناه على المضى قدما فيما أردناه من خدمة لغة الوحى، وفيما أرداه الله تعالى لنا من جهد فيها

وقد صدق الله العظيم حينما قال فى كتابه الكريم ﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ إِلَى عَالِمِ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُم بِمَا كُنتُمْ تَعْمَلُونَ﴾.

محمد أحمد دربالة

الدار العربية للنشر والتوزيع

المقدمة

الحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي هَدَانَا لِهَذَا وَمَا كُنَّا لِنَهْتَدِيَ لَوْلَا أَنْ هَدَانَا اللَّهُ

صدق الله العظيم

يهتم هذا الكتاب بجانبين اثنين فقط من جوانب التكنولوجيا الحيوية، هما مزارع الأنسجة والهندسة الوراثية، كما يهتم بتطبيقاتهما فى مجال تحسين النباتات فقط، إلا أن هذا المجال – الذى نتناوله بالدراسة – يتسع كثيرا ليتضمن أهدافا عدة تصب أساسًا فى خدمة الإنتاج الزراعى النباتى، الذى يتسع – بدوره – ليحقق الأهداف المرجوة منه فى توفير الغذاء المناسب لكل من الإنسان والحيوانات الزراعية، وليكون فى خدمة أهداف أخرى بيئية، وصيدلانية، وصناعية، وذلك بتحويل النباتات – سواء أكانت راقية، أم دنيئة – إلى مصانع أو مفاعلات بيولوجية تتخصص فى إنتاج مركبات بعينها بكميات كبيرة يمكن استخدامها – بصورة اقتصادية – فى المجالات الصيدلانية والصناعية المختلفة

يُستعمل مصطلح مزارع الأنسجة tissue culture فى هذا الكتاب ليعنى به مزارع البروتوبلاست والخلايا والأنسجة والأعضاء النباتيه تحت ظروف معقمه وغنى عن البيان أن مزارع الأنسجة – وهى علم قائم بذاته – أصبحت أدة هامه يعتمد عليها المربى اعتمادا متزايدًا فى تحقيق أهداف برامج التربية

كما تعد تقنيات الدنا (مصطلح الدنا تعريب للـ دى إن أى D N A، وهو من وضع الأستاذ الدكتور أحمد مستجير – كلية الزراعة – جامعة القاهرة) وعلم الهندسة الوراثية أحدث العلوم التى يعتمد عليها علم تربية النبات لأجل التحسين الوراثى للنباتات ولا شك أن التقدم فى تلك العلوم الوراثية يتسارع بصورة مذهلة يتحتم معها أن يكون لمربى على دراية عامة بها، وبإمكانيات الاستفادة منها فى مجال التربية، لكى لا يجد نفسه متخلفا عن ركب التقدم العلمى فى مجال وثيق الصلة بتخصصه.

إن هذا الكتاب يتطرق إلى تفاصيل تطبيقات مزارع الأنسجة والهندسة الوراثية فى مجال تحسين النباتات، وكذلك إلى كافة جوانب هذين العلمين التى يتعين على المربى الإلمام بها، ليتمكن من تحقيق أهدافه، أو – على الأقل – ليتمكن – عن وعى وإدراك

– من التعاون مع المتخصصين فيهما كذلك تطرق الكتاب إلى الأسس العامة – فقط – لكل من علمى مزارع الأنسجة والهندسة الوراثية، لكن دون الدخول فى التفاصيل الدقيقة لهما. ولذا .. فإن هذا الكتاب يعد مرجعًا – أرجو أن يكون مفيدًا – لكل من. مربى النباتات، والمبتدئين فى مجالى زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية، وكذلك المتعاونين مع مربى النباتات من المتخصصين فى هذين المجالين.

وللتفاصيل المتعلقة بعناوين مادة هذا الكتاب . فإنى أقترح على القارئ مراجعة جدول المحتويات؛ فهو مفصل بما فيه الكفاية

هذا وتجدر الإشارة إلى أن التقنيات الحيوية هى – بالنسبة للمربى – مجرد أداة صحيح أنها أداة قوية، ولكنها مجرد أداة من بين عديد من الأدوات المتاحة للاستخدام فى تحسين النباتات، علمًا بأن أى فائدة يمكن أن ترجى منها لا يمكن أن تتحقق إلاّ من خلال برامج تربية النبات التقليدية؛ فتلك التقنيات تزود طرق التربية بوسائل فعالة للإسراع ببرامج التربية، ولا يمكن أن تحل محلها أو تنسخها.

وبينما لاقت تقنيات مزارع الأنسجة ترحيبًا كبيرًا من الجميع، فإن تقنيات الهندسة الوراثية قُوبلت – ولا تزال تُقابل – باعتراضات قوية من جهات شتى كان من بين المسئولين فيها المتخصصين وغير المتخصصين. ولقد كانت اعتراضات المعترضين عليها – سواء أكانت تلك الاعتراضات على أسس موضوعية، أم غير ذلك – كانت بصوت عال وبأساليب دعائية؛ مما دفع بالعامة إلى مجاراتهم برفض الهندسة الوراثية ومنتجاتها. على الرغم من أنها ما جاءت إلاّ لمساعدة البشرية على سدّ الفجوة الغذائية بين الإنتاج والاستهلاك.

وعلى الرغم من مضاعفة الإنتاج الغذائى ثلاث مرات – على مستوى العالم – منذ عام ١٩٥٠، فإن نحو ٨٠٠ مليون فرد مازالوا يعانون من سوء التغذية، معظمهم فى قارتى آسيا وأفريقيا وإضافة إلى ذلك .. فإنه يقدر أنه بحلول عام ٢٠٥٠ سوف نحتاج إلى ثلاثة أضعاف كميات الغذاء التى ينتجها العالم حاليًا. ومن الغريب أن غالبية من يعارضون الهندسة الوراثية – التى تسعى إلى سدّ هذا الفارق الهائل بين الاستهلاك والإنتاج – هم من الدول الأوروبية والأمريكية ممن لا يعانون أصلاً من مشكلة نقص

الغذاء أو سوء التغذية، وأغلب اعتراضاتهم تقوم على افتراضات غير دقيقة، أو تبنى على أسس أخلاقية، حيث يشعرون بأن التكنولوجيا الحيوية تؤثر فى النظام الطبيعى للحياة على هذا الكوكب.

وعلى أية حال .. فإن هذا الاعتراض على الهندسة الوراثية ليس الأول من نوعه، فقد قوبلت عديد من التقدمات العلمية فى مجال الإنتاج الغذائى باعتراضات مماثلة وبالشكوك من قبل المستهلكين فى بدايات تطبيقها، ذكر منها Baldwin (٢٠٠٢) — على سبيل المثال — الأغذية المعلبة، واللبن المبستر، والتلقيح الصناعى للحيوانات الزراعية، واستخدام الهرمونات فى علائق الحيوانات، والطهى بالميكروويف، وتعريض الأغذية للإشعاع، وغيرها كثير.

ولسوف يستشف القارئ من مطالعته لهذا الكتاب — وخاصة فى فصلة الأخير — أن الهندسة الوراثية جاءت لتبقى، ولسوف تستمر وتزداد ازدهارًا. ليس هذا رجمًا بالغيب أو إفراطًا فى التفاؤل، فإن الهندسة الوراثية وتطبيقاتها تتقدم بخطى عملاقة — لا أقول سنة بعد أخرى — وإنما يومًا بعد آخر. إن أكثر المتفائلين تفاؤلاً لم يكن ليخطر على بالة حجم التقدم الهائل الذى حدث فى هذا العلم وتطبيقاته خلال العشر سنوات الماضية، وحرى بنا أن نسارع باللحاق بركب التقدم العلمى فى هذا المجال قبل أن تزداد الفجوة اتساعًا عما هى عليه الآن.

والله ولى التوفيق.

أ. د. أحمد عبد المنعم حسن



محتويات الكتاب

الصفحة

الفصل الأول : تعريف بالتكنولوجيا الحيوية وأهميتها للمربى ٢٧

تعريف التكنولوجيا الحيوية ٢٧

تاريخ التقدم البحثى فى مجالات زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية ونقنيات الدنا ٢٨

أهمية مزارع الأنسجة وتقنيات الدنا والهندسة الوراثية للمربى ٣١

الفصل الثانى : أساسيات مزارع الانسجة ٤٣

مختبر زراعة الأنسجة ٤٣

مكونات بيئات الزراعة ٤٦

الأملاح غير العضوية ٤٦

الكربون ومصادر الطاقة ٤٨

الفيتامينات ٤٨

منظمات النمو ٤٨

الإضافات العضوية ٥٢

مركبات التجلل ٥٤

وحدات التعبير عن التركيز فى بيئات الزراعة ٥٥

تحديد البيئة المناسبة للزراعة ٥٨

تجربه ستويات مختلفة من مختلف المركبات التى تدخل فى تركيب بيئات الزراعة ٥٨

أهميه التوازن بين الأوكسين والسيتوكينين فى بيئات الزراعة ٦٠

أمثلة لبعض البيئات القياسية الشائعة الاستعمال ٦١

البيئت القباسية ٦١

تحضير المحاليل القياسية ٦٤

خلط مكونات البيئات وضبط الرقم الأيدروجينى (الـ pH) ٦٧

إضافة الآجار والتعقيم ٦٨

صفحة

أنواع مزارع الأنسجة ٦٩
الجزء النباتى المزروع والزراعة ٦٩
الجزء النباتى المزروع (الـ explant) ٦٩
التطهير السطحى للأجزاء النباتية المستعملة فى الزراعة ٧١
تحضين مزارع الأنسجة ٧٤
تجديد النمو فى المزارع ٧٧
مشكلة التزجج ٧٧
مصادر إضافية فى مجال مزارع الأنسجة بصورة عامة ٧٨

الفصل الثالث: مزارع الخلايا ٨١
عزل الخلايا المفردة وزراعتها ٨١
بيئات مزارع الخلايا ٨١

الفصل الرابع: مزارع البروتوبلاست ٨٧
مقدمة ٨٧
تجهيز البروتوبلاستات وزراعتها ٨٩
مصادر البروتوبلاستات وإعدادها للاستعمال ٨٩
تحضير البروتوبلاست الخام وتنقيته ٩٠
الإنزيمات المستعملة فى هضم الجدر الخلوية ٩١
بيئات مزارع البروتوبلاست ٩٥
تحضين المزارع وتجديد النمو ٩٥
أهمية مزارع البروتوبلاست ٩٩
اندماج البروتوبلاست وإنتاج الهجن الجسمية ١٠١
مقدمة ١٠١
أهمية التهجين الجسمى ١٠٤
وسائل تحفيز دمج البروتوبلاست ١٠٨

الصفحة

انتخاب الاندماجات البروتوبلاستية المرغوب فيها ١١٤

زراعة الهجن البروتوبلاستية المنتخبة وتجديد نموها ١١٥

أمثلة متنوعة للهجن البعيدة الجسمية التى أمكن الحصول عليها بدمج البروتوبلاست ١١٥

الهجن السيتوبلازمية (السيبردز) ١٢٣

استخدامات تقنية دمج البروتوبلاست فى مجال تربية النبات .. إنجازات ومحددات ١٢٩

مجالات استخدام التقنية ١٢٩

الإنجازات الهامة ١٣٢

المحددات والتحديات ١٣٦

مصادر إضافية ١٤٠

الفصل الخامس: تباينات المزارع ١٤١

تمهيد ١٤١

تباينات المزارع غير الوراثية ١٤٤

تباينات المزارع الوراثية والأساس الوراثى لظهورها ١٤٦

أمثلة لبعض أنواع تباينات المزارع ١٥١

العوامل المؤثرة فى معدل ظهور تباينات المزارع ١٥٧

مزايا وعيوب تباينات المزارع ١٦٢

استحداث الطفرات فى مزارع الأنسجة ١٦٢

انتخاب التباينات من مزارع الأنسجة ١٦٤

التوقيت المناسب لإجراء عملية الانتخاب ١٦٤

أسلوب التعريض لعوامل الشدّ التى يجرى على أساسها الانتخاب ١٦٤

التطبيقات العملية للاستفادة من تباينات المزارع ١٦٥

إنتاج الأصناف الجديدة ١٦٨

الحصول على تباينات جديدة يمكن أن تفيد فى برامج التربية ١٧٠

الصفحة

الحصول على مصادر جديدة لمقاومة الأمراض ١٧٩
الحصول على مصادر جديدة لمقاومة الآفات ١٨٨
الحصول على تباينات تتحمل الظروف البيئية القاسية ١٨٩
تحمل الملوحة ١٩١
تحمل الحرارة المنخفضة ٢٠٢
تحمل الحرارة العالية ٢٠٢
تحمل الجفاف ٢٠٢
تحمل التركيزات العاليه للحديد والألومنيوم فى الأراضى الحامضية ٢٠٣
تحمل مبيدات الحشائش ٢٠٣
مصادر إضافية ٢٠٨

الفصل السادس : الإكثار الدقيق ٢٠٩

تمهيد ٢٠٩
مراحل الإكثار الدقيق ٢١٣
طرق التكاثر وتحديد النمو فى مزارع الإكثار الدقيق ٢١٤
مزارع الأنسجة والأعضاء النباتيه ٢١٤
مزارع الكالس والخلايا و البروتوبلاست ٢٢٢
بيئات الزراعه المستخدمة فى الإكثار الدقيق ٢٢٦
مزارع القمه الخضريه ٢٣١
الجزء النباتى المستخدم فى الزراعه ٢٣١
الاكثار الدقيق للانواع الخشبيه ٢٣٢
التطعيم الدقيق للقمه الخضريه ٢٣٥
مزارع القمه الخضريه المرستيمية ٢٣٦
العوامل المؤثره فى عمليه الإكثار الدقيق ٢٤٢
اولا بيئه الزراعه ٢٤٢
ثانيا الضوء ٢٤٤

	الصفحة
ثالثاً: درجة الحرارة	٢٤٥
التحديات التى تواجه عمليات الإكثار الدقيق	٢٤٦
تطبيقات الإكثار الدقيق فى مجال تربية النباتات وإكثارها	٢٤٨
استعراض للتطبيقات	٢٤٨
التطبيقات فى مجال الإكثار التجارى	٢٥٢
التطبيقات فى مجال التربية بالطفرات	٢٥٦
التطبيقات فى مجال التكاثر بالبذور الصناعية من الأجنة العرضية	٢٥٦
التطبيقات فى مجال حفظ الجيرمبلازم	٢٦٠
مصادر إضافية	٢٦٨
الفصل السابع: مزارع النباتات الأحادية المجموعة الكروموسومية	٢٦٩
تمهيد	٢٦٩
مزارع المتوك وحبوب اللقاح، والخلايا الوالدة للجراثيم الصغيرة	٢٧٠
خطوات تكوين النباتات الأحادية	٢٧٠
العوامل المؤثرة فى عملية التوالد البكرى	٢٧٤
بيئات الزراعة	٢٧٨
خطوات الزراعة	٢٨٠
قوائم بالأنواع النباتية التى أمكن إكثارها	٢٨٢
مزارع المبايض والبويضات	٢٨٨
عزل الأجنة الأحادية فى التهجينات البعيدة	٢٩٠
الحصول على الأجنة الأحادية بمعاملة الطور الجاميطى بالإشعاع	٢٩٠
إنتاج النباتات الأحادية المضاعفة	٢٩٢
مزارع النباتات الأحادية كمصدر للتباينات الوراثية	٢٩٦
الأساس الوراثى للتباينات	٢٩٦
مصادر التباينات الوراثية	٢٩٧
وسائل التحكم فى معدل ظهور التباينات الوراثية	٢٩٨

الصفحة

استخدامات النباتات الأحادية فى مجال تربية النبات	٢٩٨
أصناف المحاصيل الزراعية التى طورت من خلال تربية النباتات الأحادية	٣٠٤
مصادر إضافية	٣٠٨
الفصل الثامن : التهجين فى البيئات الصناعية ومزارع الأجنة والإندوسبرم	٣٠٩
إجراء التهجينات فى البيئات الصناعية	٣٠٩
إجراء التهجينات فى مزارع الأزهار	٣٠٩
إجراء التهجينات فى مزارع البويضات	٣١٠
بيئات مزارع المبايض والبويضات	٣١١
أهمية مزارع المبايض والبويضات للمربى	٣١٢
مزارع الأجنة	٣١٥
نبذة تاريخية	٣١٦
بيئات مزارع الأجنة	٣١٦
خطوات زراعة الأجنة	٣٢١
العوامل المؤثرة فى نمو الأجنة المزروعة	٣٢٢
وسائل حماية الأجنة من الانهيار	٣٢٤
أهمية مزارع الأجنة	٣٢٥
مزارع الإندوسبرم وأهميتها	٣٢٩
الفصل التاسع : المعلمات الوراثية والتربية الجزيئية	٣٣٣
طرز المعلمات الوراثية	٣٣٣
المعلمات المورفولوجية	٣٣٣
المعلمات البروتينية	٣٣٤
معلمات الدنا أو المعلمات الجزيئية	٣٣٥
الشروط التى يجب توفرها فى المعلمات الوراثية	٣٣٦

الصفحة

تقنيات الدنا وإكثارها وأنواع المعلمات الجزيئية ٣٣٨
تقنية الـ Polymerase Chain Reaction ٣٣٨
الأيزوزيمات (الأيزوانزيمات والألloزيمات) ٣٣٩
تقنية الـ Restriction Fragment Length Polymorphism ٣٤٠
تقنية الـ Random Ampilified Polymorphic DNA ٣٤٢
تقنيات أخرى ٣٤٣
أهمية المعلمات الوراثية لمربى النبات ٣٤٤
أهمية المعلمات الأيزوانزيمية ٣٤٤
أهمية تحليل الـ RFLP ٣٤٧
أهداف التربية الجزيئية ٣٤٧
التعرف على الجينات المرغوب فيها ورسم الخرائط الكروموسومية الجزيئية ٣٤٨
التطبيقات العملية فى مجال تسهيل إجراء وزيادة كفاءة برامج التربية ٣٥٧
محددات الاعتماد على التربيه الجزيئية فى تربية النبات ٣٦٤
مصادر إضافية ٣٦٤

الفصل العاشر : مقدمات فى الهندسة الوراثية ٣٦٥
تمهيد ٣٦٥
المفهوم العام للهندسة الوراثية ٣٦٨
الجينوم الإنسانى والجينومات النموذج ٣٧٤
الجينوم الإنسانى ٣٧٤
الجينومات النموذج أو الموديل ٣٧٤
الجينوم النباتى الموديل: أرابيدوبسس ثاليانا ٣٧٥
مصادر متنوعة فى مجال الهندسة الوراثية ٣٨٠

الفصل الحادى عشر : الهندسة الوراثية : الأسس العلمية وتقنيات الدنا ٣٨٥
تمهيد ٣٨٥

الصفحة

عزل وإكثار الجينات gene cloning: المبادئ العامة	٣٨٥
الدنا كمصدر للتتابعات النيكليوتيدية	٣٨٧
الرنا كمصدر للتتابعات النيكليوتيدية	٣٨٨
التخليق المعملى كمصدر للنيكليوتيدات	٣٨٩
خطوات الـ gene cloning	٣٨٩
عزل وإكثار الجينات gene cloning: الوسائل والتقنيات	٣٩٠
تمهيد	٣٩٠
التعرف على الجينات وعزلها وفصلها وتحديد تتابعاتها	٣٩٤
إكثار الجينات وأجزاء الأحماض النووية عن طريق الـ vectors	٣٩٦
إكثار واستنساخ الجينات بتقنية الـ PCR	٤٠٠
المكتبة الجينومية	٤٠١
الإنزيمات المستعملة فى مجال الـ gene cloning	٤٠٩
إنزيمات القطع	٤١٠
الإنزيمات النووية nucleases الأخرى	٤١٦
إنزيمات البوليميريز	٤١٨
الإنزيمات التى تحور نهايات جزيئات الدنا	٤١٩
إنزيمات وصل الدنا	٤٢٠
الفصل الثانى عشر: طرق التحول الوراثى: الاستراتجيات والوسائل والتحديات	٤٢٣
تمهيد	٤٢٣
متطلبات التعبير الجينى والتعرف على التحول الوراثى	٤٢٣
تقنية شفرة الرنا العكسية	٤٢٤
طرق واستراتيجيات التحول الوراثى .. نظرة عامة	٤٢٥
متطلبات نجاح عملية التحول الوراثى	٤٢٨
التربية بالتحول الوراثى	٤٢٩
التحول الوراثى عن طريق بكتيريا الأجروباكتيريم	٤٣٠
مدى عوائل الأجروباكتيريم	٤٣٢

الصفحة

باتولوجى الإصابة بالأجروباكتيريم ٤٣٣
بلازميد الأجروباكتيريم: تركيبه ودوره فى إحداث النمو السرطانى ٤٣٥
بلازميد الأجروباكتيريم: إعداده وتجهيزه لعمليات التحول الوراثى ٤٣٨
متطلبات وخطوات عملية التحول الوراثى ببكتيريا الأجروباكتيريم ٤٤١
مزايا وعيوب التحول الوراثى بطريق الأجروباكتيريم ٤٤٥
التحول الوراثى عن طريق الفيروسات ٤٤٦
التحول الوراثى بالطرق الفيزيائية والكيميائية (طرق النقل المباشر للجينات) ٤٤٨
حصول البروتوبلاست على الدنا بطريقة فيزيائية/كيميائية ٤٥١
التحول الوراثى بطريقة تحوصل الليبوسومات ٤٥١
التحول الوراثى باستخدام أشعة الليزر ٤٥٢
التحول الوراثى بالاستعانة بألياف كاربيد السيليكون ٤٥٢
طريقه تحضين البذور مع الدنا ٤٥٢
طريقة التثقيب الكهربائى ٤٥٢
التحول الوراثى بطريقة الحقن الدقيق ٤٥٣
التحول الوراثى بطريقة الحقن فى النباتات ذاتها، وخاصة فى مبايض الأزهار ٤٥٤
النقل المباشر للجينات من خلال مسار الأنابيب اللقاحية ٤٥٥
طريقة القذف المدفعى الدقيق ٤٥٥
انتخاب الخلايا المحولة وراثياً ووسائل تأكيد التحول الوراثى ٤٦٢
أولا المعلمات الانتخابية ٤٦٣
ثانيا معلمات الغربلة ٤٦٦
الجينات المؤسسة أو المُعزّزه ٤٧١
اختبار التأكد من حدوث التحول الوراثى ٤٧٥
الخصائص التى تختلف فيها النباتات المحولة وراثياً عن غيرها ٤٧٧

الصفحة
تحديات التحول الوراثى والتعبير الجينى فى النباتات المحولة وراثياً ٤٨٠
التعبير الجينى المؤقت والتعبير الدائم فى النباتات المحولة وراثيًّا ٤٨١
توقف التعبير الجينى فى النباتات المحولة وراثيًّا ٤٨١
الدنا المتحرك ودوره فى وقف التعبير الجينى ٤٨٤

الفصل الثالث عشر: الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش ٤٩١
تمهيد ٤٩١
العوامل التى حَفَّزت التقدم فى مجال الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش ٤٩١
طرق واستراتيجيات الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش ٤٩٢
التحول الوراثى لتحمل أنواع مختلفة من مبيدات الحشائش ٤٩٥
الجلايفوسيت ٤٩٥
الترايازين ٤٩٦
المبيدات المؤثرة فى الإنزيم أسيتوهيدروكسى آسد سنثيز ٤٩٧
التطبيقات العملية لعمليات التحول الوراثى لتحمل مبيدات الحشائش ٤٩٨
الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش فى الطحالب المثبتة لآزوت الهواء الجوى ٤٩٩

الفصل الرابع عشر: الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات ٥٠٣
التحول الوراثى بجينات فيروسية ٥٠٣
الشفرة الوراثية الكاملة لسلالة ضعيفة من الفيرس ٥٠٤
جين الغلاف البروتينى للفيرس ٥٠٥
جين تكاثر الفيرس ٥١٤
جين حركة الفيرس ٥١٧
جين البروتين المتعدد الفيروسى ٥١٨

صفحة

شفرة الرنا الفيروسي العكسية ٥١٨

شفرة عديدة – ونكل بعينه -- من الرنا الفيروسي ٥٢٠

الرنا الفيروسي التابع وجزيئات الرنا المشوهة المعيبة تعمل للفيرس ٥٢١

التحول الوراثي بجينات من العائل تختص بمقاومة الفيروسات ٥٢٤

الجينات التي تشفر للإنزيمات ذات العلاقة بعملية ظهور المرض ٥٢٤

جينات المقاومة الطبيعية في العائل ٥٢٥

التحول الوراثي بجينات نباتية المصدر تشفر لبروتينات مضادة للفيروسات ٥٢٦

التحول الوراثي بجينات من الثدييات ٥٢٧

جينات تكوين الأجسام المضادة ٥٢٧

إنزيم الثدييات oligoadenylate synthase ٥٢٨

استعراض للإنجازات في مجال التحول الوراثي لمقاومة الفيروسات ٥٢٩

الفصل الخامس عشر : الهندسة الوراثية لمقاومة الحشرات والنيماتودا ٥٣٥

الاعتماد على جينات المقاومة الطبيعية في عمليات التحول الوراثي ٥٣٥

طرز المقاومة للحشرات ٥٣٥

استراتيجية التحول الوراثي لمقاومة الحشرات بالاعتماد على جينات المقاومة الطبيعية ٥٣٧

جينات المقاومة الطبيعية للنيماتودا ٥٣٨

استراتيجيات التحول الوراثي لمقاومة الحشرات ٥٤٠

غربلة مصادر المقاومة ٥٤١

جينات المقاومة ومصادرها ٥٤١

مثبطات البروتييز ٥٤٣

مثبطات البروتييز التي تستحث الجروح تكوينها ٥٤٥

مثبطات الببسين ٥٤٥

مثبطات السيرين ٥٤٦

الصفحة
مثبطات بروَمان/برك (مثبطات التربسن والكيموتربسن) ٥٤٦
مثبطات الأميليز ٥٥٠
اللكتينات النباتية ٥٥١
إنزيمات الشيتينيز ٥٥٤
الجمع بين الجينات ذات المصادر النباتية والمقارنة بينها ٥٥٦
مصادر أخرى لجينات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات ٥٥٧
البروتينات البلورية للبكتيريا باسيلس ثورنجيننسس ٥٦٠
أنواع السموم وطبيعة سميتها للحشرات ٥٦١
تقسيم السلالات البكتيرية والسموم التى تنتجها ٥٦٣
التقدمات فى عمليات التحول الوراثى وجينات الـ Cry الأكثر شيوعًا ٥٦٤
كسر مقاومة الجين Cry ٥٧٠

الفصل السادس عشر: الهندسة الوراثية لمقاومة الفطريات والبكتيريا ٥٧٥
الاعتماد على جينات المقاومة الطبيعية فى عمليات التحول الوراثى ٥٧٥
الاعتماد على الجينات التى تتحكم فى إنتاج البروتينات المضادة للفطريات ٥٧٧
إنزيمات الشيتينيز والجلوكونيز ٥٧٨
بروتينات الديفنسين ٥٨١
الإنزيمات المثبطة لنشاط الريبوسومات ٥٨٢
بروتينات أخرى تفيد فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الأمراض ٥٨٢
الاعتماد على الجينات التى تتحكم فى إنتاج مركبات مضادة للفطريات ٥٨٣
الجينات التى تتحكم فى إنتاج الفيتوألاكسينات ٥٨٣
جينات المضادات الحيوية ٥٨٤
الجينات التى تتحكم فى إنتاج مركبات أخرى ٥٨٥
الجينات المستعملة فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة البكتيريا ٥٨٦

الصفحة

جينات المقاومة الطبيعية	٥٨٦
التعبير عن جينات البكتيروفاجات	٥٨٨
الجينات التى تشفر لبروتينات مضادة للبكتيريا	٥٨٨
الجينات التى تشفر لتكوين مركبات مضادة للبكتيريا	٥٨٩
الجينات التى تشفر لتكوين إنزيمات تلغى التأثير السام للسموم البكتيرية	٥٩١
الاستراتيجيات الأخرى لهندسة نباتات مقاومة للأمراض	٥٩٣
الإنجازات فى مجال التحول الوراثى لمقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية	٥٩٣
الفصل السابع عشر : الهندسة الوراثية لتحمل الظروف البيئية القاسية	٥٩٧
التحول الوراثى لتحمل أكثر من واحد من عوامل الشدّ البيئى	٥٩٧
الاعتماد على جين الجليسين بيتين	٥٩٧
الاعتماد على جينات لـ "حاميات أسموزية" أخرى	٦٠٠
الاعتماد على الجينات المتحكمة فى إنتاج مضادات الأكسدة	٦٠٠
التحول الوراثى لتحمل حالات خاصة من الشدّ البيئى	٦٠٣
تحمل الملوحة العالية	٦٠٣
تحمل ظروف الجفاف	٦٠٦
تحمل الحرارة العالية	٦٠٧
تحمل الحرارة المنخفضة والتجمد	٦٠٧
الفصل الثامن عشر : الهندسة الوراثية لتحسين صفات الجودة	٦١١
التحول الوراثى لتحسين القيمة الغذائية	٦١١
التحسين الكمى والنوعى للمحتوى البروتينى	٦١١
التحسين الكمى والنوعى للمحتوى الكربوهيدراتى	٦١٦
التحسين النوعى لمحتوى الدهون	٦٢٠
تحسين محتوى الفيتامينات	٦٢٤

الصفحة

تحسين محتوى الحديد	٦٢٧
التحول الوراثى لتحسين صفات الجودة فى بعض الخضر الثمرية	٦٢٨
تحسين القدرة التخزينية لثمار الطماطم، وما يرتبط بذلك من صفات ثمرية أخرى	٦٢٨
تحسين القدره التخرينية لثمار الكنتالوب (القاوون)، وما يرتبط بذلك من صفات ثمرية أخرى	٦٣٦
تحسين بعض صفات الجودة الأخرى فى ثمار الطماطم	٦٣٩
التحول الوراثى لتحسين صفات الجودة فى أزهار الزينة	٦٤٠
التحكم فى لون الأزهار	٦٤٠
التحكم فى شكل الأزهار	٦٤٣
تحسين قدرة الزهور على الاحتفاظ بنضارتها بعد القطف	٦٤٤
الفصل التاسع عشر: الهندسة الوراثية للتحكم فى نمو وتطور النباتات ولأهداف أخرى زراعية وبيئية وطبية وصناعية	٦٤٥
التحول الوراثى لأجل التحكم فى نمو وتطور النباتات	٦٤٥
التحكم فى تمثيل الهرمونات النباتية	٦٤٥
تحسين القدرة على البناء الضوئى	٦٤٧
التحكم فى إنتاج الفيتوكروم	٦٤٩
منع التلون البنى الإنزيمى	٦٥٠
العقد البكرى للثمار	٦٥١
العقم الذكرى	٦٥١
التحول الوراثى لأغراض المكافحة الحيوية	٦٥٤
التحول الوراثى لأجل التخلص من العناصر الثقيلة فى البيئة	٦٥٥
التحول الوراثى للأغراض الطبية	٦٥٦
إنتاج اللقاحات	٦٥٧
إنتاج بروتين حليب المرضعات	٦٦١

الصفحة

إنتاج الهرمونات ٦٦١
إنتاج عقاقير أخرى متنوعة ٦٦١
التحول الوراثى للأغراض الصناعية ٦٦١
إنتاج الإنزيمات ٦٦٢
إنتاج بلاستيك يتحلل بيولوجيًا ٦٦٦

الفصل العشرون: تطبيقات الهندسة الوراثية بين الحقائق والأوهام، والرفض والقبول ٦٦٩

الاعتراضات على الهندسة الوراثية ومبررات رفض منتجاتها: أهى حقائق، أم أوهام؟ ٦٧٠
تمهيد ٦٧٠
الانتشار غير المرغوب فيه لبعض جينات التحول الوراثى بطريق التلقيح الخلطى الطبيعى ٦٧٣
القول بأن النباتات المحولة وراثيًا يمكن أن تصبح – ذاتها – حشائش ٦٨٢
المطالبة بالتخلص من الجينات المعلمة (مثل جينات المقاومة لمضادات الحيوية) من النباتات المحولة وراثيًا ٦٨٣
أخطار محتملة لجينات المقاومة للفيروسات الفيروسية المنشأ ٦٨٦
التخوف من أخطار محتملة للجين Bt ٦٨٦
التخوف من أخطار محتملة لجينات المقاومة للأمراض الفطرية والبكتيرية ٦٩٢
التخوف من احتواء النباتات المحولة وراثيًا على بروتينات يمكن أن تسبب الحساسية للإنسان ٦٩٢
الاعتراض على تقنية إنهاء حياة البذور ٦٩٣
تفنيد الاعتراضات على الهندسة الوراثية ٦٩٦
الاختبارات التى تجرى على الأصناف المحولة وراثيًا قبل إطلاق زراعتها ٧٠١

الصفحة
الانتشار الواسع لتطبيقات الهندسة الوراثية على أرض الواقع ٧٠٤
استعراض لأبرز إنجازات الهندسة الوراثية فى شتى المجالات ٧٠٤
استعراض لنوعيات الجينات التى استخدمت فى عمليات التحول الوراثى فى شتى المحاصيل ٧٠٩
استعراض للتطبيقات العملية للهندسة الوراثية فى الزراعة ٧١٦

مصادر الكتاب ٧٤١

الفصل الأول

تعريف بالتكنولوجيا الحيوية وأهميتها لمربى النبات

تعريف التكنولوجيا الحيوية

يختلف تعريف مصطلح التقنية الحيوية (أو التكنولوجيا الحيوية) biotechnology باختلاف المشتغلين بها وقد أُطلق مصطلح التقنية الحيوية الجديدة new biotechnology ليعني به — عادة — استعمال تقنيات الدنا (الـ دى إن أى DNA)، إلاّ أن التقنية الحيوية ذاتها لها أبعاد أكبر، فهى تتضمن أى تقنية تستعمل فيها الأنواع البيولوجية والكتل الخلوية الحية biomass، أو مشتقاتها بهدف التوصل إلى منتجات مفيدة ومن هذا المنطلق فإن التربية الكلاسيكية للنباتات يمكن اعتبارها تقنية حيوية قديمة old biotechnology

ويجمع تعريف الكونجرس الأمريكى للتكنولوجيا الحيوية — الذى وضع فى عام ١٩٨٤ — بين كل من التكنولوجيا القديمة والحديثة على حد سواء، فهو يحددها بأى تقنية تستعمل فيها الكائنات الحية أو أجزاء منها لعمل منتجات جديدة أو محورة، بهدف تحسين النباتات أو الحيوانات، أو تطوير كائنات دقيقة لاستعمالات خاصة (عن Meiri & Altman ١٩٩٨)

ويستعمل مصطلح الهندسة الوراثية Genetic Engineering (أو التحول الوراثى Genetic Transformation) — أحيانا — كمرادف لمصطلح التقنية البيولوجية Biotechnology، إلاّ أن المصطلح الأخير أوسع وأشمل، ويدخل ضمنه كل تقنيات الهندسة الوراثية وتتضمن التقنيات البيولوجية — إلى جانب الهندسة الوراثية -- كل تقنيات مزارع الخلايا، والأنسجة، والبروتوبلازم، واندماج البرتوبلازم، وتقنيات أخرى تهم الصناعات التى تعتمد على نظم حيوية معينة أما الهندسة الوراثية فيعنى بها عزل وتنقية جينات معينة، وإدخالها بتقنيات خاصة فى الكائنات الحية لتغييرها وراثيًا

تاريخ التقدم البحثي في مجالات زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية وتقنيات الدنا

من بين أهم الإنجازات البحثية في مجالات زراعة الأنسجة الوراثية وتقنيات الدنا، ما يلي (عن Chawla ٢٠٠٠)

السنة	الموضوع	الباحثون[1]
١٩٠٢	أول محاولة لزراعة الأنسجة النباتية	Haberlandt
١٩٠٤	محاولة زراعة أجنة بعض الصليبيات	Hanning
١٩٢٢	استنبات بذور الـ orchid في بيئة صناعية (إنبات asymbiotic)	Kudson
١٩٢٢	زراعة القمم النامية للجذور في بيئة صناعية	Robbins
١٩٢٥	استخدام تقنية زراعة الأجنة في الهجن النوعية للـ *Linum*	Laibach
١٩٣٤	زراعة نسيج الكامبيوم لعدد من الأشجار والشجيرات في بيئة صناعية	Gautheret
١٩٣٤	نجاح زراعة جذور الطماطم في بيئة صناعية	White
١٩٣٩	مجاح سعمر ر نمو مر رع لكاس	Gautheret وآخرون
١٩٤٠	زراعة أنسجة الكامبيوم للـ Ulmus لدراسة تكوين الجذور العرضية	Gautheret
١٩٤١	استخدام لبن (إندوسبرم) جوز الهند – لأول مرة – في مزارع أنسجة الداتورة	van Overbeek
١٩٤١	زراعة أنسجة أورام التاجي في بيئة صناعية	Braun
١٩٤٤	تكوين النموات الخضرية العرضية في مزارع أنسجة التبغ	Skoog
١٩٤٦	إنتاج نباتات كاملة من الـ *Lupinus*، والـ *Tropaeolum* عن طريق مزارع القمم النامية	Ball
١٩٥٠	تجديد نمو أعضاء من نسيج كالس *Sequoia sempervirens*	Ball
١٩٥٢	استخدام مزارع القمة الميرستيمية في الحصول على نباتات خالية من الفيروس	Morel & Martin
١٩٥٢	أول تطبيق للتطعيم الدقيق micrografting	Morel & Martin
١٩٥٣	الحصول على كالس أحادي من أحد نباتات معراة البذور (*Ginkgo biloba*) من حبوب اللقاح	Tulecke
١٩٥٤	الحصول على أول نبات من خلية واحدة	Muir وآخرون
١٩٥٥	اكتشاف الكينتين وهو هرمون مسئول عن الانقسام الخلوي	Miller وآخرون
١٩٥٧	اكتشاف إمكان تنظيم تكوين الأعضاء بتغيير نسبة الأوكسين إلى السيتوكينين	Skoog & Miller

السنة	الموضوع	الباحثون[1]
١٩٥٨	تجديد نمو أجنة جسمية فى البيئات الصناعية من نواة بيضات الحمضيات	Maheshwari & Rangaswamy
١٩٥٩	تجديد نمو الأجنة من تجمعات كالس لمعلق خلايا الجزر	Reinert, Steward
١٩٥٩	نشر أول كتاب دليل عن مزارع الأنسجة النباتية	Gautheret
١٩٦٠	أول إخصاب ناجح فى الأنابيب لنبات *papaver rhoeas*	Kanta
١٩٦٠	استخدام طريقة الزراعة الدقيقة لتنمية خلايا مفردة فى نقط معلقة hanging drops فى بيئة خاصة	Jones وآخرون
١٩٦٠	تحليل الجدر الخلوية إنزيميًا للحصول على أعداد كبيرة من البروتوبلاستات	Cocking
١٩٦٠	ترشيح معلقات الخلايا وعزل الخلايا الفردة بطريق الزراعة فى بيئة صناعية	Bergman
١٩٦٢	تطوير بيئة موراشيج وسكوج Murashige & Skoog المغذية	Murashige & Skoog
١٩٦٤	إنتاج أول نباتات أحادية من حبوب لقاح الداتورة	Guha & Masheshwari
١٩٧٠	انتخاب طفرات بيوكيميائية فى البيئات الصناعية باستعمال تباينات حُصل عليها فى مزارع الأنسجة	Carlson
١٩٧٠	أول نجاح لعملية دمج البروتوبلاست	Power وآخرون
١٩٧٠	اكتشاف أول إنزيم قاطع للدنا فى موضع محدد restriction endonuclease فى *Haemophillus influenzae*، والذى أطلق عليه – فيما بعد – الاسم Hind II	Smith
١٩٧١	عمل أول خريطة لأماكن القطع الإنزيمى بالدنا restriction map باستعمال إنزيم Hind II ودنا SV 40، والذى تم قطعه إلى ١١ جزءًا	Nathans
١٩٧١	تجديد نمو أول نباتات من البروتوبلاستات	Takabe وآخرون
١٩٧٢	نجاح أول تهجين جسمى نوعى، وذلك بدمج بروتوبلاستات نوعين من الـ *Nicotiana*	Carlson
١٩٧٢	التحام قطعتان من الدنا – أيًّا كان مصدرهما – وانتجتا بنفس الإنزيم القاطع – التحامهما بفعل إنزيم DNA ligase	Mertz & Davis
١٩٧٢	تطوير طريقة يمكن عن طريقها إضافة إنزيم مناسب للئ أى فراغ فى خيط دنا مفرد، واستعمال الـ DNA ligase للصق قطعتان من الدنا؛ ومن ثم الحصول على دنا جديد مختلف recombinant DNA	Lobban & Kaiser

السنة	الموضوع	الباحثون
١٩٧٣	استعمال تقنية Lobban & Kaiser في الحصول على بلازميد هجين hybrid plasmid؛ حيث تم إيلاج قطعة Eco RI من جزيء الدنا في البلازميد الحلقي لدنا بكتيري باستعمال DNA ligase	Boyer & Cohen
١٩٧٣	اكتشاف قدرة السيتوكينين على كسر سكون الأجزاء النباتية المزروعة explants المتحصل عليها من الثورة الهامة capitulum للجربارة *Gerbera*	Pierik وآخرون
١٩٧٤	تجديد نمو نباتات بيتونيا أحادية البروتوبلاستات	Binding
١٩٧٤	التحويل الوراثي في مزارع الأنسجة النباتية	Reinhard
١٩٧٤	اكتشاف أن الـ Ti plasmid هو المسئول عن تكوين الأورام (الثآليل) التي تحدثها البكتيريا *Agrobacterium*	Zaenen وآخرون، و Larebeke وآخرون
١٩٧٥	الانتخاب في مزارع كالوس الذرة لمقاومة السم T للفطر *Helminthosporium maydis*	Gengenbach & Green
١٩٧٦	النمو الخضري من القمم النامية للقرنفل التي سبق حفظها على -١٩٦م	Seibert
١٩٧٦	اكتشاف التحكم الوراثي في كل من تمثيل الـ octopine، والـ nopaline وتحللهما بواسطة الـ Ti plasmid للـ *A. tumefaciens*	Bomhoff وآخرون
١٩٧٧	الدمج الناجح لدنا الـ Ti plasmid في النباتات	Chilton وآخرون
١٩٧٧	التوصل إلى طريقة للتعرف على ترتيب القواعد النيتروجينية في الجينات gene sequencing على أساس تحليل سلسلة الدنا	Maxam & Gilbert
١٩٧٧	التوصل إلى طريقة للتعرف على ترتيب القواعد النيتروجينية في الجينات على أساس إنهاء سلسلة الدنا عن طريق الـ dideoxy	Sanger & Coulson
١٩٧٧	اكتشاف الجينات المنشقة أو المنفصلة split genes	Sharp & Roberts
١٩٧٨	التهجين الجسمي بين الطماطم والبطاطس وإنتاج الـ pomato	Melchers وآخرون
١٩٧٩	تطوير طريقة للزراعة المشتركة لتحويل البروتوبلاستات النباتية بواسطة الـ *Agrobacterium*	Marton وآخرون
١٩٨١	أول استعمال للمصطلح somaclonal variation	Larkin & Scowcroft
١٩٨٤	تحويل التبغ وراثيًا بواسطة الـ *Agrobacterium* وإنتاج النباتات المحولة الوراثية	De Block وآخرون، و Horsch وآخرون
١٩٨٦	إنتاج نباتات تبغ وطماطم محولة وراثيًا بإدخال الـ cDNA لجين الغلاف البروتيني للـ TMV لجعلهما مقاومين للفيرس	Powell-Abel وآخرون

السنة	الموضوع	الباحثون[أ]
١٩٨٧	تطوير قاذفة الجينات التى تستعمل فى التحويل الوراثى للنباتات	Sanford وآخـــرون، و Klein وآخرون

(أ) للإطلاع على المصادر الأصلية لتلك التقدمات البحثية يراجع Chawla (٢٠٠٠)

ويبين شكل (١-١) التقدمات النوعية التى تحققت فى مجال التقنيات الحيوية خلال القرن العشرين.

أهمية مزارع الأنسجة وتقنيات الدنا والهندسة الوراثية للمربى

يتضمن هذا الكتاب عرضًا مفصلاً لأهمية مزارع الأنسجة وتقنيات الدنا والهندسة الوراثية للمربى؛ ولذا .. فإن ما نتناوله بالشرح الآن ليس أكثر من مجرد تقديم للموضوع.

ويمكن حصر أهمية التكنولوجيا الحيوية للمربى – بصورة خاصة – وفى مجال الإنتاج الزراعى – بصورة عامة – فيما يلى:

١ – الإكثار الدقيق:

يحتل الإكثار الدقيق – الذى نتناوله بالتفصيل فى فصل لاحق من هذا الكتاب – أهمية خاصة فى كافة تقنيات مزارع الأنسجة وعمليات التحول الوراثى، كما لا تخفى أهميته بالنسبة للمربى، الذى يستفيد من الإكثار الدقيق فى جوانب عديدة من برامج التربية

وتقسم طرق التكاثر الدقيق التى يتم بها مضاعفة النمو النباتى فى مزارع الأنسجة، كما يلى:

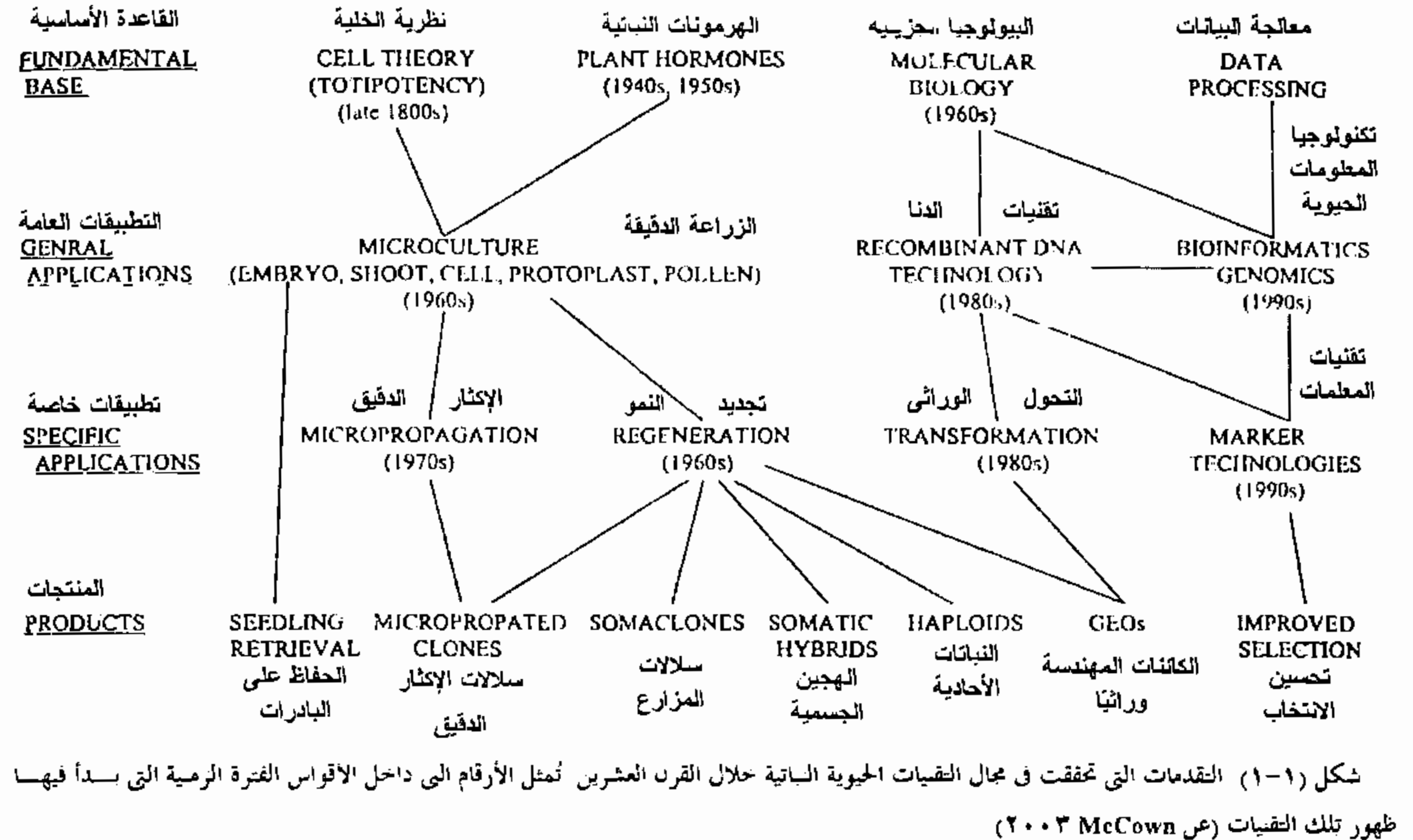
أ – مزارع القمة الميرستيمية meristem-tip culture.

ب – التطعيم الدقيق micrografting.

جـ – مزارع القمة الخضرية shoot-tip culture.

د – مزارع النموات الخضرية العرضية adventitious shoot culture.

هـ – مزارع الأنسجة والخلايا tissue and cell cultures .. وهى التى تقسم – بدورها – إلى الفئات التالية:



شكل (١-١) التقدمات التى تحققت فى مجال التقنيات الحيوية النباتية خلال القرن العشرين تُمثل الأرقام التى داخل الأقواس الفترة الزمنية التى بدأ فيها ظهور تلك التقنيات (عن McCown ٢٠٠٣)

(١) مزارع الكالوس callus culture

(٢) مزارع معلقات الخلايا cell suspension

(٣) مزارع البروتوبلاست protoplast culture

كما تقسم طرق تكاثر النباتات البذرية بزراعة الأعضاء التكاثرية، كما يلى:

أ – مزارع المتوك وحبوب اللقاح anther and pollen culture

ب – مزارع البويضات ovule culture

جـ – مزارع الأجنة embryo culture

د – مزارع البذور seed culture

هـ – مزارع الجراثيم spore culture (كما فى السرخس ferns)

وقد استخدمت تقنية استنبات البذور فى البيئات الصناعية فى تقصير فترة الجيل فى برامج التربية، وخاصة فى محاصيل الفاكهة ونباتات الزينة الخشبية، حيث تتضمن مميزاتها تجنب السكون (كما فى أجناس *Prunus*، و *Iris*، و *Vaccinium*). وزيادة نسبة نجاح الحصول على البادرات من البذور (كما فى الجنس *Rubus*). والتكوين التلقائى للجيرمبلازم فى صورة مزارع أنسجة – عند استنبات بذوره – بما يسمح بتخزينه وسرعة إكثاره

وإذا ما أخذت الجوانب المتنوعة للإكثار الدقيق فى الحسبان، فإن تأثيرها فى مجال الإنتاج النباتى كان كبيرًا وعلى سبيل المثال فإن عدد النباتات التى تنتج سنويًا بطريقة الإكثار الدقيق – على مستوى العالم – ومعظمها من المحاصيل البستانية يربو على ٥٠٠ مليون نبات (عن McCown ٢٠٠٣)

٢ – دفع الأنواع – التى يصعب إزهارها – إلى الإزهار فى مزارع الأنسجة

تفيد عملية دفع النباتات للإزهار فى مزارع الأنسجة فى تربية الأنواع النباتية التى يصعب إزهارها، وتلك التى لا تزهر سوى مرة واحدة كل عدة سنوات. ومن الأمثلة الهامة على الحالة الأخيرة نبات الغاب bamboo الذى يزهر مرة واحدة خلال فترة حياته، ثم يموت فى نهاية موسم النمو الذى حدث فيه الإزهار، الأمر الذى يحدث – بعد ١٢–٢٤ سنة من النمو – فجأة، وفى كل العشيرة النباتية، دونما سابق دليل على

احتمالات الإزهار، الأمر الذى يجعل تربية الغاب صعبًا للغاية. ولكن مع التوصل إلى طريقة سهلة وسريعة لإزهار عدة أجناس وأنواع من الغاب فى البيئات الصناعية .. أصبح من الممكن تربية ذلك النبات.

تتلخص طريقة إزهار الغاب — التى لا تتطلب سوى أشهرًا قليلة — فى زراعة بادرات الغاب – المنتجة فى البيئات الصناعية – فى بيئة موراشيج وسكوج سائلة ومزودة بـ ٢٪ سكروز، و ٥٪ لبن (إندوسبرم) جوز الهند، و ٠,٥ مجم/لتر من BAP (أى: 6-benzyladenine) ووضعها فى هزاز دوار على ٢٨°م، وإضاءة قوتها ٥٠٠ لكس.

كذلك أمكن إزهار الأوركيد بسهولة وباستمرار فى مزارع الأنسجة بعد نحو ستة شهور من الزراعة، علمًا بأنه يستغرق — عادة — نحو ٣-٦ سنوات لكى يصل إلى مرحلة الإزهار.

ومن واقع النتائج المشجعة للغاية الخاصة بسهولة إزهار عديد من الأنواع النباتية فى مزارع الأنسجة (جدول ١-١)، فإنه يمكن التفاؤل بإمكان تطبيق تلك التقنية على أى نبات (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

جدول (١-١): الأنواع النباتية التى أمكن دفعها إلى الإزهار فى مزارع الأنسجة.

النوع	الجزء النباتى المزروع	منظمات النمو التى أضيفت إلى بيئة الزراعة[أ]
Allium sativum	أنسجة زهرية	GA_3
Begonia spp.	جزء من الساق	Kinetin, Adenine
Chrysanthemum spp.	القمة الخضرية	GA_3
Cucumis sativus	السويقة الجنينية السفلى	BAP, 2,4-D
Dianthus caryophyllus	المتك	Kinetin, cocconut milk, IAA
Heliantus anus	القمة الخضرية	BAP or Kinetin
Manihot esculenta	القمة الخضرية	BAP, IAA, GA_3
Nicotiana tabacum	طبقات رقيقة من الحامل النورى	BAP, Kinetin, IAA

تابع جدول (١-١): الأنواع النباتية التى أمكن دفعها إلى الإزهار فى مزارع الأنسجة.

النوع	الجزء النباتى المزروع	منظمات النمو التى أضيفت إلى بيئة الزراعة[أ]
Panax ginseng	أجنة جسمية	BAP, GA_4
Pisum sativum	القمة الخضرية	BAP, NAA
Spinacia oleracea	القمة الخضرية	GA_3, GA_7
Xanthium strumarium	القمة الخضرية	Kinetin

أ – مفتاح الرموز:

BAP: 6-benzyladenine
2,4-D. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
GA, gibberellic acid
IAA indole-3-acetic acid
NAA α-napthaleneacetic acid

٣ – التحسين الوراثى للجيرمبلازم:

إن من أهم تطبيقات تقنيات مزارع الأنسجة والدنا فى مجال تربية النبات والتحسين الوراثى للجيرمبلازم المتوفر، ما يلى (Ahloowalia ١٩٩٨):

التقنية	التطبيقات
الإكثار الدقيق	إدامة السلالات الخضرية – الإكثار على نطاق واسع – إنتاج بذور الهجن
مزارع الأجنة	إجراء التهجينات البعيدة – توسيع القاعدة الوراثية – نقل صفات جديدة
تكوين الأجنة الجسمية	استحداث الطفرات – الحصول على تباينات المزارع – الانتخاب – إنتاج البذور الصناعية
الإخصاب فى بيئة الزراعة	استخدام عدم التوافق الذاتى فى إنتاج الأصناف الهجين
مزارع المتوك والمبايض	الحصول على نباتات أحادية مضاعفة – الحصول على سلالات أصيلة للهجن، والأصناف التركيبية والمركبة
دمج البروتوبلاست	توسيع القاعدة الوراثية

التقنية	التطبيقات
نقل عضيات الخلية	التحكم فى مكزنات السيتوبلازم – العقم الذكرى
التحكم فى بيئة الزراعة	مقاومة مبيدات الحشائش – إضافة العوامل الكيميائية المطفرة
تعريض المزارع وبادئات المزارع للإشعاع	التخلص من الارتباطات غير المرغوب فيها فى الـ cybrids والهجن والتهجينات البعيدة
مجسات الدنا DNA probes	كشف الأمراض – تعرف الجنس – الانتخاب للصفات – خرائط جينات الصفات الكمية
Recombinant DNA	التحول الوراثى – تحديد مواقع الجينات – إيلاج الجينات واستبعادها ووضع الخرائط لها

ونعرض فى القائمة التالية لعدد من المصادر التى يمكن الرجوع إليها فى مجال زراعة الأنسجة، مع بيان المجال الذى يتناوله كل منها.

المرجع	الموضوع
Morel (١٩٧٢)	تطبيقات مزارع الأنسجة – بصورة عامة – فى مجال تربية النبات
Ledoux (١٩٧٥)	التطبيقات بصورة عامة
Street (١٩٧٥)	تطبيقات مزارع الخلايا
Day (١٩٨٠)	التطبيقات فى مجال التربية لمقاومة الأمراض
Cooking & Riley (١٩٨١)	تطبيقات مزارع الأنسجة وتهجين الخلايا الجسمية
Jensen (١٩٨١)	تطبيقات مزارع الخلايا والأنسجة فى مجال تربية النبات والدراسات الوراثية
Thorpe (١٩٨١)	التطبيقات فى مختلف المجالات الزراعية
Vasil وآخرون (١٩٨٢)	التطبيقات بصورة شاملة
Bhojwani & Razdan (١٩٨٣)	شامل لمزارع الأنسجة وتطبيقاتها
Mantell & Smith (١٩٨٣)	شامل لمزارع الأنسجة وتطبيقاتها
Cailloux (١٩٨٤)	الاستخدامات فى مجالات الإكثار السريع، واستحداث الطفرات، ودمج البروتوبلاست
Prakash & Pierik (١٩٩٣)	تطبيقات التقنيات الحيوية – وخاصة الإكثار الدقيق – فى مجال تربية النبات
Giles وآخرون (١٩٩٣)	تطبيقات مزارع الأنسجة فى تربية قصب السكر، والذرة، وفول الصويا

المرجع	الموضوع
Dixon & Gonzales (١٩٩٤)	تطبيقات مزارع الخلايا فى تربية النبات (مرجع عملى شامل ومختصر لمعظم جوانب الموضوع)
Withers & Engelman (١٩٩٨)	حفظ الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة
Kurz & Constabel (١٩٩٨)	استخدامات مزارع الأنسجة العادية والمحولة وراثيًا فى إنتاج مركبات الأيض الثانوية
Pauls (١٩٩٦)	استخدامات النباتات الأحادية – ناتج مزارع الأنسجة – فى دراسات التحكم الوراثى للصفات المتنحية
Taji وآخرون (٢٠٠٢)	موجز شامل لمختلف تقنيات مزارع الأنسجة فى مجال تربية النبات

ولقد ظهرت تقنيات مُعَلِّمات الدنا DNA marker technologies فى نهاية القرن العشرين كوسيلة جديدة لتحليل الهيئة الوراثية genome، حيث تُفيد فى عملية الانتخاب المباشر، فيما يعرف باسم marker-assisted selection، وخاصة فى الصفات النوعية، ولكن التقنية بدأ استخدامها – كذلك – فى الانتخاب للصفات الكمية (عن McCown ٢٠٠٣).

هذا .. إلا أن جميع التقنيات التى أسلفنا الإشارة إليها لا تعطى كامل الفائدة المرجوة منها إلاّ إذا استعملت ضمن برنامج تربية تقليدى للتحسين الوراثى. وعلى الرغم من قوة التقنيات الحيوية، فإنها تتطلب – دائمًا – توفر قاعدة من الجيرمبلازم الجيد لكى يمكن البناء عليها، كما تتطلب توفر برامج اختبار وتقييم فعالة.

٤ – الهندسة الوراثية للنباتات:

إن الأهمية الكبرى للهندسة الوراثية تكمن فى أنه أصبح فى الإمكان فصل جينات مرغوب فيها بصورة نقية، وإدخالها فى نباتات من نفس النوع، أو من أنواع أخرى. تماثل هذه الخطوة فى نتائجها برنامجاً كاملاً للتربية بطريقة التهجين الرجعى، دون الدخول فى أى من مشاكل التربية، خاصة ارتباط الصفات المرغب فيها بصفات أخرى غير مرغوب فيها. كما أن تأثير الجين يتحدد – جزئيًا – بموقعه من الجينات الأخرى على الكروموسوم؛ وعليه .. فإن إدخال جين ما إلى مواقع مختلفة من الكروموسومات

يعنى الحصول على تباينات وراثية، لا تتوفر فى الظروف الطبيعية؛ نظرًا لأن الجين يحتل موقعا ثابتا على الكروموسوم، ومن المؤكد أن النباتات الجديدة المتحولة وراثيًّا سوف تختلف فى عدد نسخ الجين التى تنتقل إليها، والموقع (أو المواقع) الكروموسومية التى تستقر بها هذه النسخ الجينية وينتج عن ذلك كله تباينات لا حصر لها، قد يكون بعضها مرغوبًا فيه ويعنى ذلك أن خطوة انتخاب النباتات المرغوب فيها بعد إحداث التحول الوراثى لا تقل أهمية عن عملية التحول الوراثى ذاتها، كما يعنى — كذلك — ضرورة إنتاج تحولات وراثية كثيرة؛ لكى تزيد فرصة الحصول على تغيرات مرغب فيها (عن Flavell ١٩٨٢)

لقد استعملت طريقتين رئيسيتين فى عمليات التحول الوراثى، هما باستعمال ناقلات معينة، وبالنقل المباشر. أما الناقلات فقد كان الاعتماد الأكبر على البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* ولكن استعملت أيضًا *A. Rhizogenes*، وقد طور من النوع البكتيرى الأول طرازين، عرفا بالإسمين: co-integration، و binary. وقد شاع إجراء التحول الوراثى بطريق الناقلات بدرجة أكبر عن طريق النقل المباشر.

وقد طورت أكثر من ١٤ وسيلة للنقل المباشر للجينات، كانت أولاها ما يعرف باسم electroporation فى عام ١٩٨٦، وأعقبها طرق أخرى كانت أبرزها وأكثرها استعمالا وفاعلية طريقة القذف الدقيق microprojectile bombardment فى عام ١٩٩٠.

ولا يمكن أن تكتمل الفائدة المرجوة من التحولات الوراثية — التى تكون على مستوى الخلايا المفردة — إلاّ بتوفر وسيلة فعالة لتجديد النمو، ووسيلة أخرى ناجحة لانتخاب الخلايا التى تحدث بها التحولات. وقد كان الاعتماد الأكبر فى عملية الانتخاب — ولا يزال — قائمًا على أساس تحمل الخلايا المحولة وراثيًّا للمضادات الحيوية أو لمبيدات الحشائش؛ علمًا بأن تلك الصفات تنقل إلى الخلايا المحولة وراثيًّا مع الجينات المراد نقلها وقد لا قى هذا الأسلوب فى انتخاب الخلايا المحولة وراثيًّا انتقادات واسعة نظرًا لاحتواء النباتات الناتجة من عملية التحول الوراثى على جينات المقاومة تلك وقد جرت محاولات للتخلص من تلك الجينات بعد انتخاب النباتات المحولة وراثيًّا (عن McCown ٢٠٠٣).

ولقد كان الأنسولين هو أول المركبات التجارية المفيدة التى أمكن إنتاجها من البكتيريا بعد تحويلها وراثيًا بأساليب الهندسة الوراثية، وذلك فى عام ١٩٨٦. وعلى الرغم من أن أول نجاح معملى فى هندسة النبات وراثيًا حدث فى عام ١٩٨٠، فإن أول الأصناف النباتية الغذائية المحولة وراثيًا (صنف الطماطم FlavrSavr) لم تتوفر تجاريًا سوى فى عام ١٩٩٤. ويدل ذلك الفارق الزمنى الكبير على الجهد الهائل الذى يتعين بذله لإخراج النباتات المحولة وراثيًا من المختبرات ومحطات البحوث إلى العالم الواقعى الذى لا يزال رافضًا لكثير من المنتجات المهندسة وراثيًا، خاصة ما يتعلق منها بغذاء الإنسان، فى الوقت الذى يتقبل فيه بسعة صدر المنتجات الصيدلانية التى تنتجها الكائنات الدقيقة المحولة وراثيًا (عن Bent & Yu ١٩٩٩).

يجب أن توضع تقنيات الهندسة الوراثية فى مكانها الطبيعى من تربية النبات؛ فمقابل كل صفة واحدة يتم نقلها بطرق الهندسة الوراثية توجد ألف صفة أخرى يتعين على المربى تداولها بطرق التربية التقليدية لكى يكون الصنف الجديد المنتج مقبولاً. ولقد ثبت أن تطوير عمليات عزل الجينات المرغوب فيها ونقلها إلى النباتات المرغوب فى تحسينها والتأكد من التعبير عنها بصورة ثابتة ومقبولة فى النباتات المحولة وراثيًا لهو أمر بطئ ومكلف وكثيرًا ما ينتهى إلى لا شئ. وعلى الرغم من ذلك فإن قصص النجاح فى هذا المجال يؤيدها انتشار زراعة الأصناف المحولة وراثيًا والمقاومة للحشرات والفيروسات ومبيدات الحشائش؛ الأمر الذى يجعل من الهندسة الوراثية حقيقة قائمة (عن Bent & Yu ١٩٩٩).

لقد بلغت المساحة الإجمالية التى زرعت بالمحاصيل المحولة (المهندسة) وراثيًا فى عام ٢٠٠٢ — على مستوى العالم — أكثر من ٥٥ مليون هكتار (١٣١ مليون فدان) فى ١٣ دولة. وبإنتاج تلك المحاصيل استفاد من تقنيات الهندسة الوراثية أكبر من ٥,٥ مليون مزارع؛ علما بأن التوسع فى زراعة المحاصيل وراثيًا ازداد بمعدل أكبر من ١٠٪ سنويًا. وقد حدث كل ذلك التوسع فى الإنتاج الزراعى لتلك المحاصيل فى خلال عقد واحد من الزمان وباستثناء الباباظ، فإن أغلب الإنتاج الزراعى من المحاصيل المهندسة وراثيًا كان من المحاصيل الحقلية (عن McCown ٢٠٠٣)

تتبقى كلمة أخيرة فى هذا الموضوع، وهى أن تربية النبات ليست مجرد نقل جين مرغوب فيه من نوع نباتى إلى آخر، بل إنها تتضمن خطوات كثيرة، وتقييما مستمرًا لكى ينتهى البرنامج بصنف يقبله المزارعون، والمستهلكون، ويكون له مستقبل فى الزراعة التجارية، ولا يتحقق ذلك بالهندسة الوراثية وحدها؛ فلابد من التعاون الوثيق بين علماء الهندسة الوراثية، ومربى النبات، لكى تعطى الهندسة الوراثية ثمارها، فهى ليست أكثر من أداة لزيادة الاختلافات الوراثية، أما تطوير الجيرمبلازم الجديد إلى أن يصبح صنفا مقبولاً .. فإنه يبقى من مهام مربى النبات (عن Moore ١٩٨٨)

٥ – منتجات صيدلانية خاصة يُحصل عليها من مزارع الأنسجة:

تتنوع كثيرا المنتجات الصيدلانية التى يُحصل عليها من مزارع الأنسجة، والتى نعرض بعضها فى جدولى (١-٢)، و (١-٣)

جدول (١-٢) محصول المنتجات التجارية الممكنة لبعض مزارع الأنسجة (عن Scragg ١٩٩٨).

النوع النباتى	المنتج	المحصول (%)	الاستعمال
Coleus blumei	Rosmarinic acid	٣٦ ٢١	—
Morinda citrifolia	Anthraquinones	١٨	—
Lithospermum erythrorhizon	Shikonin	١٢ ٤	مضاد لبكتيريا
Thalictrum minus	Berberine	١٠ ٦	دواء
Perilla frutescens	Anthocyanins	٨ ٩	-
Discorea deltoidea	Diosegnin	٣.٨	استيرويدى
Papaver somniferum	Morphine	٠ ٠٢٥	دواء
	Sanguinarine	٢ ٥	مضاد حيوى
Taxus brevifolia	Paclitaxel	٠ ٠٦	مضاد سرطانى
Catharanthus roseus	Vincristine	--	مضاد لسرطان الدم

جدول (١-٣): أمثلة لبعض مركبات الأيض الثانوية التى تنتج فى مزارع الأنسجة (عن Scragg ١٩٩٨).

المزرعة	النوع النباتى	المنتَج
مزارع الجذور		
	Atropa belladonna	Tropane alkaloids
	Catharanthus roseus	Ajmalicine
	Papaver bracteatum	Thebane
	Papaver somniferum	Codeine
	Senecio spp.	Pyrrolizidine alkaloids
مزارع النموات الخضرية		
	Atropa belladona	Tropane alkaloids
	Rauwolfia serpentina	Ajmalicine
	Digitalis purpurea	Digitoxin
	Pelargonium fragrans	Pinene
	Cinchona ledgeriana	Quinine
	Centranthus macrosiphon	Valpotriates
	Linum flavum	Coniferin
	Coleus forskohoo	Forskolin



الفصل الثانى

أساسيات مزارع الأنسجة

مختبر زراعة الأنسجة

تجرى زراعة الأنسجة تحت ظروف معقمة فى مختبرات خاصة، يجب أن تتوفر فيها شروط معينة، وأن تجهز تجهيزا خاصًا؛ فيجب أن يحتوى المختبر على غرفة خاصة لتحضير البيئات، وأخرى لزراعة الأنسجة وثالثة لحضانة المزارع وحفظها. ويجب أن يزود المختبر بقائمة طويلة من مختلف أنواع الزجاجيات، والمركبات الكيميائية، والحضّانات، والأدوات، والأجهزة المختبرية العادية (التى تتوفر — عادة — فى مختبرات أمراض النبات)، بالإضافة إلى حيزٍ مبّرد مناسب فى الثلاجات لتخزين المزارع والبيئات. ويتعين أن يكون المختبر منيعًا ضد الأتربة، التى يمكن أن تلوث المزارع والبيئات فى حالة انتشارها فى هواء المختبر. كما يجب أن تتوفر فى المختبر الأفران التى تستخدم فى تعقيم الزجاجيات، وأوتوكليف لتعقيم البيئات، ومختلف أنواع المطهرات السطحية (مثل هيبوكلوريد الصوديوم أو الكالسيوم، وفوق أكسيد الأيدروجين، ونترات الفضة، وكلوريد الزئبق، والمضادات الحيوية)؛ لتطهير العينات النباتية سطحيًا.

وفيما يلى قائمة بأهم المعدات التى يجب أن تتوفر فى مختبر زراعة الأنسجة:

١ — دوارق مخروطية بأحجام: ١٠٠، و ٢٥٠، و ٥٠٠ مل، و ١، و ٥ لترات.

٢ — دوارق معيارية بأحجام: ٥٠٠ مل، و ١، و ٢، و ٣ لترات.

٣ — مخابير مدرجة بأحجام: ٢٥، و ٥٠، و ١٠٠، و ٥٠٠ مل، ولتر واحد.

٤ — ماصات مدرجة بأحجام: ١، و ٢، و ٥، و ١٠ مل.

٥ — ماصات باستير.

٦ — أوعية مزارع (أنابيب المزارع، وزجاجات بأحجام مختلفة لها أغطية "بقلاووظ"، وأطباق بترى).

٧ – "دلاء" بلاستيكية لنقع الزجاجيات قبل غسيلها

٨ – حجرة أو حيز خاص صغير مزود بالهواء الساخن، لتجفيف الأوعية، والزجاجيات بعد غسيلها

٩ – فرن لتجفيف الأوعية والزجاجيات، وتعقيم الزجاجيات.

١٠ – سلال سلكية، توضع بها أوعية البيئات الصغيرة في أثناء تعقيمها، والزجاجيات الصغيرة في أثناء تجفيفها.

١١ – جهاز لتقطير الماء

١٢ – أوعية بلاستيكية (بحجمي ١٠، و ٢٠ لترًا)؛ لتخزين الماء المقطر

١٣ – ميزانان؛ أحدهما لوزن الكميات الصغيرة، والثاني لوزن الكميات الكبيرة نسبيًا

١٤ – قرص ساخن hot plate مع قلاب مغناطيسي magnetic stirrer؛ لإذابة المركبات الكيميائية

١٥ – مضخة تفريغ exhaust pump لتسهيل عملية التعقيم بالترشيح

١٦ – قنينات بلاستيكية بأحجام مختلفة لتخزين المحاليل سائلة أو مجمدة

١٧ – ثلاجة لتخزين المركبات الكيميائية، والمحاليل القياسية التي تحضر منها البيئات بالعينات النباتية

١٨ – مجمدة لتخزين المحاليل القياسية لفترات أطول، وبعض الإنزيمات. ولبن جوز الهند إلخ

١٩ جهاز توليد بخار steamer؛ لإذابة الآجار والبيئات

٢٠ – جهاز قياس الـ pH لضبط pH البيئات والمحاليل

٢١ – أوتوكليف (جهاز تعقيم بالبخار تحت ضغط)، أو قدور طهي تحت ضغط؛ لتعقيم البيئات

٢٢ – قرص ساخن مُنَظم بالحرارة heat-regulated plate؛ للتعقيم بالبخار في قدور الطهي تحت ضغط.

٢٣ – أغشية مرشحات تعقيم ومواسكها؛ لتعقيم المحاليل بالترشيح

٢٤ – حقن بلاستيكية معقمة؛ لغرض الاستعمال مع المحاليل المعقمة بالترشيح.

٢٥ — عربة صغيرة مزودة بصوانٍ مناسبة، لنقل البيئات والأدوات.

٢٦ — حجرة محكمة الغلق Inoculation Chamber يتجدد فيها الهواء بعد ترشيحه، لاستخدامها فى كل العمليات التى تجرى فى ظروف معقمة.

٢٧ — لبة (شعلة) كحول spirit lamp أو مصباح بنزن bunsen burner، لتعقيم الأدوات باللهب.

٢٨ — رشاشة صغيرة atomizer، لرش الكحول داخل حجرة العزل والتلقيح.

٢٩ — زجاجات ذات أغطية "بقلاووظ" ، لتعقيم العينات النباتية.

٣٠ — حامل للأدوات المعقمة.

٣١ — ملاقط كبيرة ذات أطراف غير حادة للزراعة والتلقيح.

٣٢ — ملاقط ذات أطراف حادة، لنزع بشرة الأوراق.

٣٣ — إبر دقيقة للتشريح.

٣٤ — مشارط لتقطيع الأنسجة النباتية.

٣٥ — ملاوق لزراعة الأنسجة.

٣٦ — مثقاب فلين لأخذ عينات أسطوانية من الأنسجة بحجم ثابت.

٣٧ — مجهر ثنائى العينين binocular، لتجزئ النباتات المجهرية الحجم.

٣٨ — مكيفات هواء للمحافظة على درجة حرارة ثابتة لحجرة المزارع.

٣٩ — هزاز للمزارع السائلة.

٤٠ — مناخل من الصلب الذى لا يصدأ، ذات ثقوب بأقطار مختلفة، لفصل تجمعات الخلايا التى تكون بأحجام مختلفة.

٤١ — جهاز طرد مركزى صغير، لترسيب الخلايا، بغرض تحديد حجم النمو الخلوى، ولتنظيف البروتوبلازم.

٤٢ — هيموسيتوميتر Haemocytometer لعدّ الخلايا.

٤٣ — شرائح زجاجية ذات تجويف، لتعليق المزارع السائلة فى أثناء فحصها.

٤٤ — شرائح زجاجية عادية وأغطية شرائح، لعمل تحضيرات مجهرية من الخلايا والأنسجة.

٤٥ — مجهر لفحص الخلايا والأنسجة.

مكونات بيئات الزراعة

يجب أن تتوفر فى بيئات الزراعة Culture Media كافة الاحتياجات الغذائية والهرمونية التى تلزم الأنسجة وتميزها. وتختلف هذه الاحتياجات — كثيرًا — ليس فقط من نوع نباتى إلى آخر، وإنما أيضا من جزء إلى آخر فى النبات الواحد

ونقدم — فيما يلى — عرضا لأهم المكونات التى تدخل فى تحضير بيئات الزراعة (عن Chawla ٢٠٠٠)

الأملاح غير العضوية

يجب أن تتوفر فى بيئات مزارع الأنسجة جميع العناصر الضرورية للنمو النباتى، سواء أكانت عناصر كبرى (وهى تلك التى تحتاجها النباتات بتركيزات تزيد عن ٠٫٥ مللى مولار. وتتضمن النيتروجين، والفوسفور، والبوتاسيوم، والكالسيوم، والمغنيسيوم، والكبريت)، أم صغرى (وهى تلك التى تحتاجها النباتات بتركيزات لا تزيد عن ٠٫٥ مللى مولار، وتتضمن الحديد، والمنجنيز، والبورون، والنحاس، والزنك، واليود، والموليبدنم، والكوبلت).

عند إذابة الأملاح المعدنية فى الماء فإنها تتحلل وتتأين، وتعد الأيونات — وليست الأملاح — هى العامل النشط فى مختلف البيئات، ولذا فإن المقارنة بين البيئات يجب أن تعتمد على تركيز محتواها من مختلف الأيونات (جدول ٢-١)

وتتباين تركيزات مختلف العناصر فى البيئات، كما يلى:

١ - النيتروجين غير العضوى يتراوح تركيزه بين ٢٥، و ٦٠ مللى مولار، مع ضرورة تواجد جزء — ولو يسير — من النيتروجين الكلى على الصورة الأمونيومية (صورة النيتروجين المختزل)، لحاجة النمو النباتى لها من جهة، ولتجنب اتجاه pH البيئة نحو الارتفاع — فى حالة تواجد كل النيتروجين فى صورة نتراتية — من جهة أخرى وعادة تستعمل النترات بتركيز ٢٥-٤٠ مللى مولار، والأمونيوم بتركيز ٢-٢٠ مللى مولار وعند استخدام الأمونيوم بتركيزات تزيد عن ٨ مللى مولار يتعين إضافة أى من

الأحماض العضوية الخاصة بدوره TCA — مثل أحماض الستريك، والماليك، والصكّنيك — إلى البيئة

٢ — يستعمل البوتاسيوم — عادة — بتركيز ٢-٢٦ مللى مولار، وغالبًا على صورة ملح النترات أو الكلوريد.

٣ — يكفى — عادة — تركيز ١-٣ مللى مولار من كل من الكالسيوم، والكبريتات، والفوسفات، والمغنيسيوم.

٤ — يستعمل الحديد فى صورة مخلبية مع الـ diamine tetra acetic acid، حيث يبقى ميسرًا حتى ولو ارتفع pH البيئة إلى ٨,٠.

جدول (٢-١): تركيز مختلف الأملاح غير العضوية فى بعض بيئات مزارع الأنسجة.

الملح	MS	B_5	N_6
العناصر الكبرى (بالمللى مولار)			
Ca	٣	١,٠	١,١
Cl	٦	٢,٢	—
K	٢٠,١	٢٥	٣١
NH_4	٢٠,٦	٢	٦,٦
NO_3	٣٩,٤	٢٥	٢٨
PO_4	١,٢٥	١,١	٢,٩٤
SO_4	١,٨	—	٠,٢
Mg	١,٥	١,٠	٠,٧٥
العناصر الصغرى (بالميكرومول)			
B	١٠٠	٥٠	٢٦
Co	٠,١١	٠,١	٠,١١
Cu	٠,١	٠,١	—
Fe	١	١	١
I	٥	٤,٥	٤,٨
Mn	٩٢,٥	٦٠	١٩,٥
Mo	١	١	—
Zn	٣٠	٧	٥,٢

الكربون ومصادر الطاقة

يعد السكروز والجلوكوز هما مصدرا الطاقة الرئيسيين المستعملين في مزارع الأنسجة، ويمكن استعمال الفراكتوز، إلاّ أنه أقل كفاءة. يتحلل السكروز في البيئة — سريعا — إلى جلوكوز وفراكتوز، حيث يستهلك الجلوكوز في البداية ويليه الفراكتوز. يستعمل السكروز - عادة - بتركيز ٢ ـ ٥٪.

ومن بين المواد الكربوهيدراتية الأخرى التي اختبر تأثيرها: اللاكتوز، والمالتوز، والجالاكتوز، والنشا، ولكنها كانت جميعا أقل كفاءة عن السكروز والجلوكوز. هذا وتحتوي معظم البيئات على الـ myo-inositol بتركيز حوالي ١٠٠ مجم/لتر، لأجل تحسين نمو الخلايا.

الفيتامينات

تقوم النباتات بتمثيل الفيتامينات التي تلزم لنموها وتطورها، إلاّ أن الخلايا النباتية في المزارع تكون في حاجة إلى مصدر للفيتامينات. يعد فيتامين B_1 (الثيامين) من الفيتامينات التي تحتم إضافتها. ويتحسن النمو بإضافة كل من حامض النيكوتينك وفيتامين B_6 (البيرودوكسين). وتحتوي بعض البيئات على الفيتامينات: حامض البنتوثينك pantothenic acid، والبيوتين، وحامض الفوليك، وبارا أمينو حامض البنزويك p-amino benoic acid، وكلوريد الكولين choline chloride، والريبوفلافين riboflavine، وحامض الأسكوربيك.

منظمات النمو

تعد الأوكسينات والسيتوكينينات أهم فئات منظمات النمو المستعملة في بيئات مزارع الأنسجة، بينما الفئات الأخرى، مثل الجبريللينات، وحامض الأبسيسك، والإثيلين .. إلخ أقل أهمية. ومن بين منظمات النمو المبينة في جدول (٢–٢)، فإن إندول حامض الخليك IAA، والزياتين هما الهرمونان الطبيعيان الوحيدان.

جدول (٢-٢) منظمات النمو المستخدمة فى بيئات الزراعة.

الاسم	التركيب الكيميائى	الوزن الجزيئى
p-Chlorophenoxy acetic acid	$C_8H_7O_3Cl$	١٨٦.٦٠
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	$C_8H_6O_3Cl_2$	٢٢١ ٠٠
Indole-3 acetic acid	$C_{10}H_9NO_2$	١٧٥ ٢
Indole-3 butyric acid	$C_{12}H_{15}NO_2$	٢٠٣,٢
α-Naptbalene acetic acid	$C_{12}H_{10}O_2$	١٨٦.٢
β-Naphthoxy acetic acid	$C_{12}H_{10}O_3$	٢٠٢,٣
Adenine	$C_5H_5N_5.3H_2O$	١٨٩,١
Adenine sulphate	$(C_5H_5N_5)_2.H_2SO_4.2H_2O$	٤٠٤,٤
Benzyl adenine	$C_{12}H_{11}N_5$	٢٢٥ ٢
N-isopentenylamino purine	$C_{10}H_{13}N_5$	٢٠٣ ٣
Kinetin	$C_{10}H_9N_5O$	٢١٥ ٢
Zeatin	$C_{10}H_{13}N_5O$	٢١٩ ٢
Gibberellic acid	$C_{19}H_{22}O_6$	٣٤٦,٤
Abscisic acid	$C_{15}H_{20}O_4$	٢٦٤ ٣
Colchicine	$C_{22}H_{25}NO_6$	٣٩٩,٤

ونعرض – فيما يلى – قائمة بأسم الأوكسينات الشائعة الاستعمال فى مزارع الأنسجة:

الاسم الكيميائى	الاسم العادى أو المختصر
2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D
2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T
2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid	Dicamba
Indole-3-acetic acid	IAA
Indole-3-butyric acid	IBA
2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid	MCPA
1-naphthylacetic acid	NAA
2-naphthyloxyacetic acid	NOA
4-amino-2,5,6-trichloropicolinic acid	Picloram

كما نقدم – فيما يلى – قائمة بأسم السيتوكينينات الشائعة الاستعمال فى مزارع الأنسجة (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الاسم العادى أو المختصر	الاسم الكيميائى
[أ]BAP	6-benzylaminopurine
[ب]2iP (IPA)	[N^6-(2-isopentyl)adenine]
[أ]Kinetin	6-furfurylaminopurine
[جـ]Thidiazuron	1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea
[ب]Zeatin	4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylaminopurine

أ – محضر صناعيًا.

ب – طبيعى.

جـ – substituted phenylurea-type

وتظهر فى جدول (٢–٣) قائمة ببعض منظمات النمو الأخرى الأقل استعمالا فى مزارع الأنسجة

جدول (٢–٣): منظمات نمو نباتية أخرى أقل استعمالاً فى مزارع الأنسجة (عن Dixon & Gonzalez ١٩٩٤).

المركب	الاسم المختصر أو العادى	الوزن الجزيئى	الوظيفة/النشاط
Chlorocholine chloride[a]	CCC	158.1	مثبط لتمثيل حامض الجبريلليك
N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea[a]	4-CPPU	247.7	شبيه بالسيتوكينين
3,6-Dichloroanisic acid	Dicamba	221.0	أوكسين
2-Naphthoxyacetic acid	NOA	202.2	أوكسين
Phenylacetic acid[a]	PAA	136.2	أوكسين
4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid	Picloram	241.5	شبيه بالأوكسين
Thidiazuron[a]	TDZ	220.2	شبيه بالسيتوكينين
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T	255.2	أوكسين
Zeatin riboside[a]	ZR	363.4	سيتوكينين

a = يوصى بتعقيمه بالترشيح

الأوكسينات

إن من أهم تأثيرات الأوكسينات تحفيزها للانقسام الخلوى وتكوين الكالوس؛ فهو يسبب انقسام الخلايا واستطالتها وانتفاخ الأنسجة، وتكوين الجذور العرضية، كما أنه غالبًا ما يثبط النمو الجانبى (الإبطى) والنمو الخضرى العرضى. وفى التركيزات المنخفضة من الأوكسينات يسود تكوين الجذور العرضية، بينما يتوقف تكوين الجذور العرضية ويتكون الكالوس فى التركيزات العالية.

وأكثر الأوكسينات استخدامًا فى مزارع الأنسجة، وأكثرها كفاءة الـ 2,4-D، كما يستخدم كذلك كل من الـ NAA، والـ IAA، و IBA، والـ *p*CPA، والـ trichlorophenoxy acetic acid (اختصارًا: 2,4,5-T)، والبكلورام picloram، وهو 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid

السيتوكينينات

تشتق السيتوكينيات من الأدنين، ولها دور هام فى حث النمو الخضرى، وأكثرها استخدامًا الكينتين، والبتريل أدنين (BA)، والبنزيل أمينو بيورين (BAP)، والـ (2iP) isopentenyladenine، وجميعها تحفز الانقسام الخلوى إذا ما أضيفت مع أحد الأوكسينات وفى التركيزات العالية (١-١٠ مجم/لتر) .. فإنها تحفز النمو الخضرى العرضى وتثبط النمو الجذرى. كما أنها تحفز النمو الجانبى (الإبطى) بتقليلها للسيادة القمية

وتخزن المحاليل القياسية للكينتين وإندول حامض الخليك فى زجاجات غير منفذة للضوء (أو زجاجات مغطاة بورق أسود) وتحفظ فى الظلام لأنها لا تكون ثابتة فى الضوء.

الجبريللينات

تستخدم الجبريللينات — عادة – فى تجديد النمو النباتى، كما يعد الـ GA_3 ضروريًا لمزارع القمم الميرستيمية لبعض الأنواع. وعمومًا .. فإن الجبريللينات تحث استطالة السيقان والنمو الميرستيمى وكذلك نمو البراعم فى البيئات، إلا أنها تثبط النمو العرضى لكل من الجذور والسيقان.

حامض الأبسيسك

يعد حامض الأبسيسك ضروريًا لحث تكوين الأجنة فى بيئات الزراعة (عن Chawla ٢٠٠٠)

الإضافات العضوية

١ – النيتروجين العضوى:

تكون الخلايا المزروعة قادرة – عادة – على تمثيل كل الأحماض الأمينية الضرورية لها، إلاّ أنه غالبًا ما تُفيد إضافة مصدرًا للنيتروجين العضوى فى صورة أحماض أمينية، مثل الجلوتامين والأسبارجين، وبعض النيوكليوتيدات، مثل الأدنين وفى حالة مزارع الخلايا تفيد كثيرًا تزويد البيئة بنحو ٠,٢–١,٠ جم/لتر من الـ casin hydrolysate، وفى بعض الحالات قد يحل الـ L-glutamine بتركيز يصل إلى ٨ مللى مولار (١٥٠ مجم/لتر) محل الـ casein hydrolysate.

عند إضافة الأحماض الأمينية إلى بيئة الزراعة فإنه يجب استعمالها بحرص إذا إنها قد تصبح مثبطة للنمو. وعادة .. فإن الأحماض الأمينية التى تضاف إلى البيئات (وتركيزها بالملليجرام/لتر بين قوسين) هى كما يلى الجليسين (٢)، والأسبارجين (١٠٠)، والتيروزين (١٠٠)، والأرجانين (١٠)، والسيستين cysteine (١٠)، وأحيانًا يضاف – كذلك – كبريتات الأدنين adenine sulphate إلى بيئات الآجار بتركيز ٢–١٢٠ مجم/لتر للمساعدة فى عملية التكوين التشكُّلى morphogensis.

٢ – الأحماض العضوية:

لا يمكن للخلايا النباتية الاعتماد على الأحماض العضوية كمصدر وحيد للكربون، إلاّ أن إضافة أحماض دورة الـ TCA، مثل الستريك، والماليك، والصكّنيك، والفيوماريك تسمح بنمو الخلايا النباتية على الأمونيوم كمصدر وحيد للنيتروجين ويمكن للخلايا تحمل تركيزات تصل إلى ١٠ مللى مولار من الحامض. كذلك فإن إضافة حامض البيروفيك تحفز نمو الخلايا المزروعة بكثافة منخفضة.

٣ - مركبات معقدة

اختبرت إضافة عديد من المستخلصات، مثل الـ protein hydrolysate، ومستخلص الخميرة، ومستخلص المولت malt extract (مستخلص الشعير المستنبت)، ولبن (إندوسبرم) جوز الهند، وعصير البرتقال، وعصير الطماطم، وقد كانت أكثرها فائدة الـ protein hydrolysate ولبن جوز الهند. ويتعين تجنب استخدام التركيزات العالية من تلك الإضافات حتى لا تضر بالنمو. ويتراوح التركيز المناسب – عادة – بين ١٠٠، و ١٠ جم/لتر، بينما يستخدم لبن جوز الهند – عادة – بتركيز ٢٪–٥٪ (حجم إلى حجم). وعمومًا .. فإن الاتجاه الغالب هو نحو استخدام بيئات ذات مكونات محددة دون الاعتماد على إضافات من مستخلصات عضوية معقدة (عن Chawla ٢٠٠٠).

هذا ويحضر محلول لبن جوز الهند للاستعمال في مزارع الأنسجة، كما يلي:

١ – يصفى اللبن (الإندوسبرم) من عدد كبير من ثمار جوز الهند، علمًا بأن العدد الكبير للثمار يفيد في تقليل التباينات بين الثمار – في مكونات اللبن ويتعين عدم استعمال لبن أي ثمار يبدو عليه تغيرات في لونه أو رائحته

٢ يتم التخلص من بروتين اللبن بغليه لمدة ١٠ دقائق.

٣ – يرشح الناتج باستعمال ورق ترشيح Whatman No 1

٤ – يتم إجراء التعقيم في الأوتوكليف بعد تجزئة الراشح إلى كميات لا يزيد حجم كل منها عن ١٠٠ مل.

٥ – تخزين الناتج على حرارة –٧٠ْم لحين الحاجة إليه.

٦ – عند الاستعمال يفكك اللبن المجهز ويضاف إلى بيئة الزراعة بتركيز حوالي ١٠٪ حجما بحجم (عن Dixon & Gonzales ١٩٩٤)

كذلك يستخدم الفحم النباتي المنشط بتركيز ٠,٢٪–٣٠٪ (وزن إلى حجم) عندما تشكل المركبات الفينولية مشكلة في مزارع الأنسجة، حيث يفيد الفحم – كذلك – في ادمصاص الصبغات البنية والسوداء الضارة، وفي تثبيت الـ pH.

وإلى جانب الفحم النباتي المنشط، فإن الـ polyvinylpurrolidone (بتركيز ٢٥٠–١٠٠٠ مجم/لتر)، وحامضي الستريك والأسكوربيك (بتركيز ١٠٠ مجم/لتر لكل منهما) تستعمل في منع أكسدة الفينولات.

وأحيانًا يضاف المركب الفينولى phloroglucinol لتثبيط الإنـزيم IAA oxidase المسئول عن تحلل الـ IAA

مركبات التجلّل

إن مركبات التجلّل gelling agents هى المسئولة عن تصلب بيئة الزراعة وتحولها إلى جلّ، ويعد الآجار agar — الذى يُتحصل عليه من الأعشاب البحرية — هو أكثرها استعمالاً، وهو مركب عديد التسكر ذات وزن جزيئ مرتفع وعند إذابة الآجار فى الماء فإنه يكون جل يربط إليه الماء ويدمص المركبات، وكلما زاد تركيز الآجار كلما زادت قدرته على ربط الماء

يستعمل — عادة — المنتج Difco Bacto agar بتركيز ٠,٦٪–١ (وزن إلى حجم)، ولكن تستعمل - كذلك صورا أخرى من الآجار، مثل الآجاروز agarose، و الـ phytagar، والـ flow gara

قد يضر استعمال تركيزات عالية من الآجار فى بيئات الزراعة، حيث تؤدى إلى شده تصلب البيئة وعدم سماحها بانتشار العناصر المغذية إلى الأنسجة

وإلى جانب الآجار، فإنه قد تستعمل أحيانًا البدائل التالية:

١ الألجينيت alaginate يستعمل خاصة فى مزارع البروتوبلاست

٢ — الجل رايت gelrite يستعمل — عادة — بتركيز ٠,٢٪، وهو يجعل البيئات رائقة وشفافة، ويلزم لتكوينه الجل تواجد كاتيونات ثنائية الشحنة مثل الـ Mg^{++}، والـ Ca^{++}

٣ — البوليمر المخلق biogel P200 وهو polyacrylamide.

هذا .. ويمكن الزراعة فى بيئة سائلة لا تحتوى على آجار، ويتم فيها توفير دعم فيزيائى للنمو بإحدى الوسائل التالية:

١ — الصوف الزجاجى أو الصوف الصخرى أو الفوم.

٢ — قنطرة من ورق ترشيح توضع فى البيئة السائلة.

٣ – كرات زجاجية صغيرة

٤ – قطعة من الإسفنج الفسكوزى viscose sponge توضع تحت ورقة ترشيح لتحمل البيئة السائلة (عن Chawla ٢٠٠٠).

وحدات التعبير عن التركيز فى بيئات الزراعة

يعبر عن التركيز فى بيئات الزراعة بإحدى طريقتين، كما يلى

١ – التركيز بالملليجرام فى اللتر

يعبر عن التركيز بالملليجرام فى اللتر (mg/l)، فمثلاً

10^{-6} = 1.0 mg/l or 1 part per million (ppm)
10^{-7} = 0.1 mg/l
10^{-9} = 0.001 mg/l or 1 ug/l

٢ – التركيز المولارى:

يحتوى المحلول المولارى على عدد من جرامات المادة مساو لوزنها الجزيئى، فمثلاً

1 molar (M) = the molecular weight in g/l
1mM = the molecular weight in mg/l or 10^{-3}M
1uM = the molecular weight in ug/l or 10^{-3}mM

ويجرى التحويل من مللى مولار (mM) إلى جزء فى المليون (mg/l) كما يلى:

مثلاً الوزن الجزيئى للأوكسين 2,4-D هو: ٢٢١,٠

إذا فإن اللتر من محلول مولارى من الـ 2,4-D يحتوى على ٢٢١ جرامًا

وبذا يحتوى اللتر من المحلول المللى مولارى (1mM) من الـ 2,4-D على ٠,٢٢١ جم، أى ٢٢١ مجم

كما يحتوى اللتر من المحلول الميكرومولارى (1uM) من الـ 2,4-D على ٠,٠٠٠٢٢١ جم، أى ٠,٢٢١ مجم

كما يجرى التحويل من جزء فى المليون (mg/l) إلى مللى مولارى (mM) كما يلى:

مثلا الوزن الجزيئى لـ $CaCl_2.2H_2O$ هو:

١٤٧ ٠١٨ = (١٦×٢) + (١,٠٠٨×٤) + (٣٥ ٤٥٣×٢) + (٤٠ ٠٨)

ولتحويل محلول كلوريد كالسيوم بتركيز ٤٤٠ جزءا فى المليون إلى مللى مولارى (mM)، تستخدم المعادلة

= ١٤٧ ١٨ / ٤٤ = ٢ ٩٩ مللى مولار

وبذا فإن ٤٤٠ مجم/لتر كلوريد كالسيوم = ٢,٩٩ مللى مولار

ويبين جدول (٢-٤) التركيز المولارى المقابل للتركيز بالجزء فى المليون بالنسبة لأهم منظمات النمو الشائعة الاستعمال فى مزارع الأنسجة

جدول (٢-٤) التحويل من مجم/لتر (mg/litre) إلى ميكرومول (uM) لبعض منظمات النمو الشائعة الاستعمال (عن Dixon & Gonzalez ١٩٩٤).

µM								
Zea	2iP	K	BAP	IBA	IAA	2,4-D	NAA	منظمات النمو
219.2	203.2	215.2	225.2	203.2	175.2	221.0	186.2	M
								Mg/litre
0.0005	0.0005	0.0005	0.0004	0.0005	0.0005	0.0004	0.0005	0.001
0.005	0.005	0.005	0.004	0.005	0.006	0.0045	0.005	0.001
0.023	0.025	0.023	0.022	0.025	0.028	0.023	0.027	0.005
0.046	0.049	0.046	0.044	0.049	0.057	0.045	0.054	0.01
0.228	0.246	0.232	0.222	0.246	0.285	0.226	0.27	0.05
0.456	0.492	0.465	0.444	0.492	0.570	0.452	0.54	010
1.14	1.23	1.16	1.11	1.23	1.43	1.13	1.34	0.25
2.28	2.46	2.32	2.22	2.46	2.85	2.26	2.69	0.50
4.56	4.92	4.65	4.44	4.92	5.71	4.52	5.37	1.0
22.81	24.61	23.23	22.20	24.61	28.54	22.62	26.85	5.0
45.62	49.21	46.47	44.4	49.21	57.08	45.25	53.71	10.0
114.05	123.03	116.17	111.01	123.03	142.69	113.12	134.26	25.0
228.10	246.06	232.34	222.02	246.06	285.39	226.24	268.53	50.0

NAA = α-naphthaleacetic acid; 2,4-D = 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; IAA = indole-3-acetic acid; IBA = indole-3-butyric acid; BAP = 6-benzylaminopurine; K = kinetin; 2iP = N-isopentenylaminopurine; Zea = zeatin.

ويبين جدول (٢-٥) التركيب الكيميائى، والوزن الجزيئى لمختلف المركبات التى تدخل فى تركيب البيئات المغذية، كما يبين جدول (٢-٦) الوزن الذرى لمختلف العناصر التى تدخل فى تكوين هذه المركبات (عن Ohojwani & Razdan ١٩٨٣ ، و Dixon ١٩٨٥)، وجميعها معلومات يتعين الإلمام بها ليمكن تحضير التركيزات المطلوبة من مختلف المركبات.

جدول (٢-٥): الوزن الجزيئى للمركبات الشائعة الاستخدام فى بيئات مزارع الأنسجة.

المركب	التركيب الكيميائى	الوزن الجزيئى
العناصر الكبرى		
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
Ammonium sulphate	$(NH_4)_2SO_4$	132.15
Calcium chloride	$CaCl_2.2H_2O$	147.02
Calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	236.16
Magnesium sulphate	$MgSO_4.7H_2O$	246.47
Potassium chloride	KCl	74.55
Potassium nitrate	KNO_3	101.11
Potassium dihydrogen ortho-phosphate	KH_2PO_4	136.09
Sodium dihydrogen ortho-phosphate	$NaH_2PO_4.2H_2O$	156.01
العناصر الصغرى		
Boric acid	H_3BO_3	61.83
Cobalt chloride	$CoCl_2.6H_2O$	237.93
Cupric sulphate	$CuSO_4.5H_2O$	249.68
Manganous sulphate	$MnSO_4.4H_2O$	223.01
Potassium iodide	KI	166.01
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	241.95
Zinc sulphate	$ZnSO_4.7H_2O$	287.54

جدول (٢-٦): الأوزان الذرية للعناصر التى تدخل فى تكوين بيئات مزارع الأنسجة.

العنصر	الرمز	الوزن الذرى
Aluminium	Al	26.98
Boron	B	10.82
Calcium	Ca	40.08
Carbon	C	12.011
Chlorine	Cl	35.457
Cobalt	Co	58.94
Copper	Cu	63.54
Hydrogen	H	1.008
Iodine	I	126.91
Iron	Fe	55.85
Magnesium	Mg	24.32
Manganese	Mn	54.94
Molybdenum	Mo	95.95
Nickel	Ni	58.71
Nitrogen	N	14.008
Oxygen	O	16.00
Phosphorus	P	30.975
Potassium	K	39.10
Sodium	Na	22.991
Sulphur	S	32.066
Zinc	Z	65.38

تحديد البيئة المناسبة للزراعة

تجربة مستويات مختلفة من مختلف المركبات التى تدخل فى تركيب بيئات الزراعة

يتعين عند العمل على نبات جديد أن يبدأ الباحث بتحديد بيئة الزراعة المناسبة لهذا النبات ويفضل دائما تجريب ثلاثة مستويات – منخفض، ومتوسط، ومرتفع – من الأنواع الأربعة من المركبات التى تدخل فى تركيب بيئات الزراعة (وهى المركبات المعدنية، والأوكسينات، والسيتوكينينات، والمغذيات العضوية)؛ وبذا فإن التجربة الأولى لتحديد أفضل بيئة للزراعة يمكن أن تتضمن ٨١ معاملة (جدول ٢-٧) ويلى ذلك إجراء تجارب أخرى أصغر؛ للتوصل إلى التركيز الأمثل من كل مركب، مع استعمال أنواع مختلفة من الأوكسينات والسيتوكينينات

جدول (٢-٧): المستويات المنخفضة، والمتوسطة، والمرتفعة لمختلف مكونات البيئات اللازمة لتحديد البيئة المثلى.

المكونات	مدى التركيزات (مللي مول/لتر)		
	منخفض	متوسط	مرتفع
مركبات معدنية			
NH_4NO_3	5	10	20
KNO_3	--	10	20
KH_2PO_4	0.1	--	--
NaH_2PO_4	--	1	2
KCl	1.9	--	--
$CaCl_2$	1	2	3
$MgSO_4$	0.5	1.5	3
H_3BO_3	0.01	0.05	0.15
$MnSO_4$	0.01	0.05	0.1
$ZnSO_4$	0.001	0.02	0.04
$CuSO_4$	0.00001	0.0001	0.0015
Na_2MoO_4	0.00001	0.0001	0.001
$CoCl_2$	0.0001	0.0005	0.001
KI	0.0005	0.0025	0.005
$FeSO_4$	0.01	0.05	0.1
Na_2.EDTA	0.01	0.05	0.1
أوكسين	0.0001	0.001	0.01
سيتوكينين	0.0001	0.001	0.01
مركبات عضوية			
Inositol	0.1	0.3	0.6
Nicotinic acid	0.004	0.02	0.04
Pyridoxine HCl	0.0006	0.003	0.006
Thiamine HCl	0.0001	0.002	0.04
Biotin	0.00004	0.0002	0.001
Folic acid	0.0005	0.001	0.002
D-Ca-Pantothenate	0.0002	0.001	0.005
Riboflavin	0.0001	0.001	0.01
Ascorbic acid	0.0001	0.001	0.01
Choline chloride	0.0001	0.001	0.01
L-Cysteine HCl	0.01	0.06	0.12
Glycine	0.0005	0.005	0.05
Sucrose	6	60	120

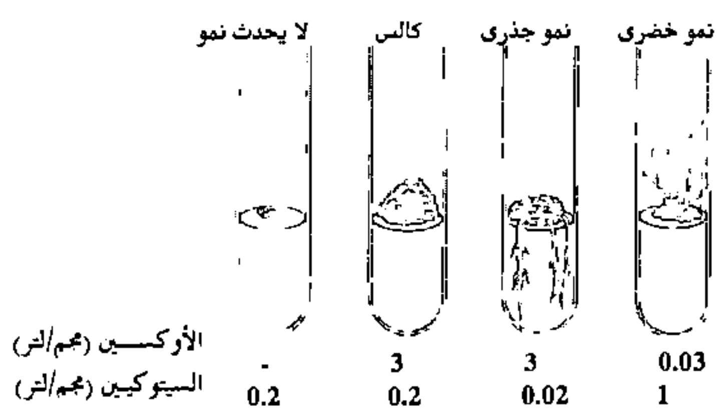
وإذا استخدم الآجار في تحضير بيئات الزراعة (يكون استخدامه غالبًا بنسبة ٨ .٪– ١٠ ٪) وتجب مراعاة ما يحتويه الآجار من عناصر (خاصة الكالسيوم والمغنيسيوم والعناصر الدقيقة) على صورة شوائب (جدول ٢–٨)

جدول (٢–٨).المحتوى الكيميائي لأنواع آجار Difco المستخدمة في مزارع الأنسجة

Purified-agar	Noble-agar	Bacto-agar	المكونات
1.75%	2.6%	4.5%	Ash
0.27%	0.23%	0.13	Calcium
0.01%	0.01%	0.01	Barium
0.09%	0.26%	0.19	Silica
0.13%	0.18%	0.43	Chloride
1.32%	1.90%	2.54	Sulphate
0.14%	0.10%	0.17	Nitrogen
11.00 mg l^{-1}	11.00 mg l^{-1}	11.00 mg l^{-1}	Iron
695.00 mg l^{-1}	260.00 mg l^{-1}	285.00 mg l^{-1}	Magnesium
20.00 mg l^{-1}	7.50 mg l^{-1}	5.00 mg l^{-1}	Copper

أهمية التوزان بين الأوكسين والسيتوكينين فى بيئات الزراعة

يلعب التوازن بين مستوى الأوكسين والسيتوكينين في بيئة الزراعة دورًا أساسيًا في نمو وتميز الأنسجة النباتية من الكالس، حيث تحفز النسب العالية من الأوكسين إلى السيتوكينين نمو الجذور، بينما تحفز النسب المنخفضة تكوين النموات الخضرية، هذا بينما تناسب النسب المئوية المتوسطة استمرار نمو الكالس دون تميز (شكل (٢–١).



شكل (٢–١): تأثير تركيز الأوكسينات والسيتوكينينات – في بيئة النمو – على تكوين الكالس، وتميز النموات الجذرية والخضرية.

أمثلة لبعض البيئات القياسية الشائعة الاستعمال

البيئات القياسية

توصل الباحثون إلى عدد من البيئات القياسية لاستخدامها فى مزارع الأنسجة (جدول ٢-٩)، وهى التى يمكن إما استخدامها مباشرة، وإما بعد إدخال التعديلات المناسبة عليها، لتصبح أكثر ملاءمة للنوع النباتى المستهدف. ويبين جدول (٢-١٠) تركيز مختلف العناصر فى كل من البيئات التى جاء ذكرها فى جدول (٢-٩).

جدول (٢-٩): البيئات القياسية المستخدمة فى مزارع الأنسجة[أ].

البيئات (الكميات بالجزء فى المليون)[ب]							
NT (ط)	Nitsch's (ح)	B (ز)	ER (و)	MS (هـ)	Heller's (د)	White's (جـ)	المكونات
							غير العضوية
825	720	--	1200	1650	--	--	NH_4NO_3
950	950	2527.5	1900	1900	--	80	KNO_3
220	--	150	440	440	75	--	$CaCl_2.2H_2O$
--	166	--	--	--	--	--	$CaCl_2$
1233	185	246.5	370	370	250	750	$MgSO_4.7H_2O$
680	68	--	340	170	--	--	KH_2PO_4
--	--	134	--	--	--	--	$(NH_4)_2SO_4$
--	--	--	--	--	--	300	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$
--	--	--	--	--	600	--	$NaNO_3$
--	--	--	--	--	--	200	$NaSO_4$
--	--	150	--	--	125	19	$NaH_2PO_2.H_2O$
--	--	--	--	--	750	65	KCl
0.83	--	0.75	--	0.83	0.01	0.75	KI
6.2	10	3	0.63	6.2	1	1.5	H_3BO_3
22.3	25	--	2.23	22.3	0.1	5	$MnSO_4.4H_2O$
--	--	10	--	--	--	--	$MnSO_4.H_2O$
--	10	2	--	8.6	1	3	$ZnSO_4.7H_2O$
8.6	--	--	--	--	--	--	$ZnSO_4.4H_2O$
--	--	--	15	--	--	--	$Zn.Na_2.EDTA$
0.25	0.25	0.25	0.025	0.25	--	--	$Na_2MoO_4.2H_2O$
--	--	--	--	--	--	0.001	MoO_3
0.025	0.025	0.025	0.0025	0.025	0.03	0.01	$CuSO_4.5H_2O$
--	--	0.025	0.0025	0.025	--	--	$CoCl_2.6H_2O$
0.03	--	--	--	--	--	--	$CoSO_4.7H_2O$
--	--	--	--	--	0.03	--	$AlCl_3$
--	--	--	--	--	0.03	--	$NiCl_2.6H_2O$
--	--	--	--	--	1	--	$FeCl_3.6H_2O$
--	--	--	--	--	--	2.5	$Fe_2(SO_4)_3$
27.8	27.8	--	27.8	27.80	--	--	$FeSO_4.7H_2O$
37.3	37.3	--	37.3	37.3	--	--	$Na_2.EDTA.2H_2O$
--	--	28	--	--	--	--	Sequestrene 330Fe

تابع جدول (٢-٩):

(ط) NT	(ح)Nitsch's	(ز)B	(و)ER	(هـ)MS	(د)Heller's	(جـ)White's	المكونات
البيئات (الكميات بالجزء في المليون)[ب]							
							العضوية
100	100	100	--	100	--	--	Inositol
--	5	1	0.5	0.5	--	0.05	Nicotinic acid
--	0.5	1	0.5	0.5	--	0.01	Pyridoxine HCl
1	0.5	10	0.5	0.1	--	0.01	Thiamine HCl
--	2	--	2	2	--	3	Glycine
--	0.5	--	--	--	--	--	Folic acid
--	0.05	--	--	--	--	--	Biotin
1%	2%	2%	4%	3%	--	2%	Sucrose
12.7%	--	--	--	--	--	--	D-Mannitol

(أ) لم تعط بيانات منظمات النمو وبيئات الزراعة الخاصة لحالات معينة.

(ب) أعطيت تركيزات المانيتول والسكروز كنسب مئوية.

(جـ) بيئة هوايت White.

(د) بيئة هلر Heller

(هـ) بيئة مراشيج وسكوج Murashige & Skoog

(و) بيئة إيركسون Eriksson

(ز) بيئة جامبورج Gamborg وآخرون

(ح) بيئة نتش Nitsch

(ط) بيئة ناجاتا وتاكيبا Nagata & Takeba

جدول (٢-١٠). تركيز الأيونات في البيئات المبينة في جدول (٢-٩)

NT	Nitsch's	B5	ER	MS	Heller's	White's	الوحدات	الأيونات
البيئات								
19.69	18.40	25.00	33.79	39.41	7.05	3.33	$mmol\ l^{-1}$	NO_3
10.30	9.00	2.00	15.00	20.62	--	--		NH_4
29.99	27.40	27.03	48.79	60.03	7.05	3.33		Total N
5.00	0.50	1.08	2.50	1.25	0.90	0.138		P
14.39	9.90	25.00	21.29	20.05	10.05	1.66		K
1.50	1.49	1.02	2.99	2.99	0.51	1.27		Ca
5.00	0.75	1.00	1.50	1.50	1.01	3.04		Mg
3.00	2.99	2.04	5.98	5.98	11.08	0.87		Cl

تابع جدول (٢-١٠).

الأيونات	الوحدات	البيئات White's	Heller's	MS	ER	BS	Nitsch's	NT
Fe	$\mu mol\ l^{-1}$	12.50	3.70	100.00	100.00	50.10	100.00	100.00
S		4502.00	1013.50	1730.00	1610.00	2079.90	996.80	5236.50
Na		2958.00	7966.00	202.00	237.20	1089.00	202.00	202.00
B		24.20	16.00	100.00	10.00	48.50	161.80	100.00
Mn		22.40	0.40	100.00	10.00	59.20	112.00	100.00
Zn		10.40	3.40	30.00	37.30	7.00	34.70	36.83
Cu		0.04	0.10	0.10	0.01	0.10	0.10	0.10
Mo		0.007	--	1.00	0.1	1.00	1.00	1.00
Co		--	--	0.10	0.01	0.10	--	0.10
I		4.50	0.06	5.00	--	4.50	--	5.00
Al		--	0.20	--	--	--	--	--
Ni		--	0.10	--	--	--	--	--

كذلك نقدم فى جدول (٢-١١) مزيداً من البيئات القياسية وتركيز مختلف المكونات فيها بالجزء فى المليون.

جدول (٢-١١): البيئات القياسية المستخدمة فى مزارع الأنسجة ومكوناتها[أ] (عن Chawla ٢٠٠٠).

المكون	Nitch & ١٩٥٦ Nitch	White ١٩٦٣	Murashige & ١٩٦٢ Skoog	Gautheret ١٩٤٢	Gamborg ١٩٦٨ (B_5)	Chu ١٩٧٨ (N_6)
KCl	١٥٠٠	٦٥	—	—	—	—
$MgSO_4.7H_2O$	٢٥٠	٧٢٠	٣٧٠	١٢٥	٢٥٠	١٨٥
$NaH_2PO_4.H_2O$	٢٥٠	١٦,٥	—	—	١٥٠	—
$CaCl_2.2H_2O$	—	—	٤٤٠	—	١٥٠	١٦٦
KNO_3	٢٠٠٠	٨٠	١٩٠٠	١٢٥	٢٥٠٠	٢٨٣٠
$CaCl_2$	٢٥	—	—	—	—	—
Na_2SO_4	—	٢٠٠	—	—	—	—
NH_4NO_3	—	—	١٦٥٠	—	—	—
KH_2PO_4	—	—	١٧٠	١٢٥	—	٤٠٠
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	—	٣٠٠	—	٥٠٠	—	—
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	—	—	١٣٤	٤٦٣

تابع جدول (٢–١١)

Chu ١٩٧٨(N.)	Gamborg ١٩٦٨ (B5)	Gautheret ١٩٤٢	Murashige & ١٩٦٢ Skoog	White ١٩٦٣	Nitch & ١٩٥٦ Nitch	المكون
—	—	٠٠٥	—	--	--	$NiSO_4$
٢٧ ٨	—	٠,٠٥	٢٧,٨	—	—	$FeSO_4.7H_2O$
-	-	٣	٢٢,٣	٧	٣	$MnSO_4.4H_2O$
٣,٣	١٠	—	—	—	—	$MnSO_4.H_2O$
٠.٨	٠ ٧٥	٠,٥	٠,٨٣	٠,٧٥	-	KI
—	٠,٠٢٥	—	٠,٠٢٥	—	—	$CoCl_2.6H_2O$
--	—	٠ ٢	—	—	--	$Te(SO_4)_3$
١ ٥	٢	٠ ١٨	٨,٦	٣	٠,٥	$ZnSO_4.7H_2O$
—	٠,٠٢٥	٠,٥	٠ ٠٢٥	—	٠,٠٢٥	$CuSO_4.5H_2O$
-		٠,١		-		$BeSO_4$
١.٦	٣	٠,٠٥	٦.٢	١,٥	٠,٥	H_3BO_3
--		١	-	--	-	N_2SO_4
—	٠,٢٥	—	٠,٢٥	—	٠,٠٢٥	$Na_2MoO_4.2H_2O$
		--		٢,٥	—	$Fe(SO_4)_3$
٣٧ ٣	—	—	٣٧,٣	—	—	EDTA disodium salt
—	٤٣	--	--	—	—	EDTA-Na ferric salt
—	١٠٠	—	١٠٠	—	—	m-inositol
١,٠	١,٠	٠,١	٠,١	٠,١	—	Thiamine
٠.٥	١,٠	٠,١	٠,٥	٠ ١	-	Pyridoxine
٠ ٥	١,٠	٠,٥	٠,٥	٠,٥	—	Nicotinic acid
-	-	٣	٢	٣	—	Glycine
—	١٠	--	—	١ ٠	—	Cysteine
٣٠٠٠٠	٢٠٠٠٠	٣٠٠٠٠	٣٠٠٠٠	٢٠٠٠٠	٣٤٠٠٠	Sucrose

(أ) جميع القيم بالمليجرام فى اللتر (جزء فى المليون).

تحضير المحاليل القياسية

يستعمل الماء المقطر فى تحضير المحاليل القياسية لكل من العناصر الكبرى والصغرى والفيتامينات ومنظمات النمو. ويجب أن تكون المركبات الكيميائية المستخدمة من أعلى درجات النقاوة

١ – المحاليل القياسية للعناصر الكبرى والصغرى:

تحضر المحاليل القياسية للعناصر الكبرى والصغرى – عادة – بنحو ١٠ أضعاف إلى

١٠٠ ضعف التركيز المطلوب من أى منها فى البيئات (جدول ٢-١٢). وعند إذابة العناصر فى الماء .. تجب إضافة كل مركب على انفراد لتجنب حدوث أى ترسيب وبالنسبة لمحلول العناصر الكبرى تتم إذابة كلوريد الكالسيوم منفردًا فى الماء، ثم يضاف إلى بقية المحلول لتجنب حدوث ترسيب.

جدول (٢-١٢): تحضير المحاليل القياسية لبيئة موراشيج وسكوج.

المكون	التركيز فى بيئة موراشيج وسكوج (مجم/لتر)	التركيز فى المحلول القياسى (مجم/لتر)	الحجم الذى يستعمل لكل لتر من البيئة (مل)
العناصر الكبرى (١٠ ×)			١٠٠
NH_4NO_3	١٦٥٠	١٦٥٠٠	
KNO_3	١٩٠٠	١٩٠٠٠	
$MgSO_4.7H_2O$	٣٧٠	٣٧٠٠	
$CaCl_2.2H_2O$	٤٤٠	٤٤٠٠	
KH_2PO_4	١٧٠	١٧٠٠	
العناصر الصغرى (١٠٠ ×)			١٠
H_3BO_3	٦,٢	٦٢٠	
$MnSO_4.4H_2O$	٢٢,٣	٢٢٣٠	
$ZnSO_4.7H_2O$	٨,٦	٨٦٠	
KI	٠,٨٣	٨٣	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠,٢٥	٢٥	
$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٢٥	٢,٥	
$CoCl.6H_2O$	٠,٠٢٥	٢,٥	
الحديد			
Fe.EDTA-Na salt	٤٠	—	
الفيتامينات		٥٠ مجم/١٠٠ لتر	١
Nicotinic acid	٠,٥	٥٠ مجم/١٠٠ لتر	٠,٢
Thiamine HCl	٠,١	٥٠ مجم/١٠٠ لتر	١
Pyridoxine	٠,٥		
مركبات أخرى			
Myo-inositol	١٠٠	—	
Sucrose	٣٠٠٠٠	—	
Agar	٨٠٠٠	—	

– لا تحضر محاليل قياسية منها.

٢ – المحاليل القياسية لمنظمات النمو:

لا يذوب أى من منظمات النمو فى الماء، وإنما تُذاب إما فى الكحول (كما فى الـ

pCPA، والـ 2,4-D، والـ GA). وإما فى محلول عيارى واحد من أيدروكسيد الصوديوم (كما فى الـ IAA، و IBA، والـ NAAα، و الـ NOA، والـ BA، والـ 2iP، والكينتين، والزياتين، وحامض الأبسيسك). يجب أن يُذاب المركب فى ملليلترات قليلة من المذيب، ثم يضاف الماء ببطء للوصول إلى الحجم المطلوب.

وعندما يُرغب فى تحضير تركيزات بالملليجرام فى اللتر تفضل إذابة ٥٠ مجم فى لتر للحصول على تركيز ٥٠ مجم/لتر

وعندما يُرغب فى تحضير تركيز بالللى مولار نفضل إذابة الكميات الموضحة فى جدول (٢-١٣) فى ١٠٠ مل للحصول على تركيز ١ مللى مولار. وإذا احتوت بيئة الزراعة على تركيز ١٠ ميكرو مولار من منظم نمو ما (وليكن 2,4-D) فإن

١ مللى مولار = ٢٢١ مجم/لتر أو ٠.٢٢١ مجم/مل

الكمية فى ١٠٠ مل من المحلول القياسى = ٠.٢٢١ × ١٠٠ = ٢٢.١ مجم

وبما أن ١٠ ميكرومولار = ٢٢١٠ ميكروجرام، أى ٢.٢١٠ مجم

إذا فإن الحجم الذى يلزم من المحلول القياسى هو ١٠ مل (لأن ٢٢.١ × ١٠ = ٢٢١ مجم) (عن Chawla ٢٠٠٠)

جدول (٢-١٣) تحضير المحاليل القياسية لمنظمات النمو

المكون	الاختصار	مجم/١٠٠ مل (1mM)
الأوكسينات		
2,4 Dichlorophenoxy acetic acid	2,4-D	٢٢.١
Indole-3 acetic acid	IAA	١٧.٥
Indole-3 butyric acid	IBA	٢٠.٣٢
α-Napthalene acetic acid	NAA	١٨.٦٢
β-Naphthoxy acetic acid	NOA	٢٠.٢٣
2,4,5-Trichlorophenoxy acetic acid	2,4,5-T	٢٥,٥٦
p-Chlorophenoxy acetic acid	pCPA	١٨,٦٦
Picloram	PIC	٢٤,١٢
السيتوكينينات		
Adenine	Ade	١٨,٩١
Benzyl adenine or benzyl amino purine	BA أو BAP	٢٢.٥٢

تابع جدول (٢-١٣)

المكون	الاختصار	مجم/١٠٠ مل (1mM)
N-isopentenylamino purine	2iP	٢٠٫٣٣
Kinetin	KIN	٢١,٥٢
Zeatin	ZEA	٢١.٩٢
مركبات أخرى		
Gibberellic acid	GA_3	٣٤,٦٤
Abscisic acid	ABA	٢٦,٤٣
Colchicine	Col	٣٩,٩٤

خلط مكونات بيئة الزراعة وضبط الرقم الأيدروجينى (الـ pH)

تجب إضافة مكونات بيئة الزراعة بنفس الترتيب الذى وردت به فى جدولى (٢-١٢، و ٢-١٣)، بما فى ذلك منظمات النمو، ويضاف الماء إلى أقل من الحجم النهائى مباشرة، ثم يُضْبط الـ pH إلى القيمة المطلوبة (مثلاً ٥٫٨ فى بيئة MS) بإضافة نقطة بنقطة من أى من محلول ١ عيارى من أيدروكسيد البوتاسيوم، أو ١ عيارى من حامض الأيدروكلوريك، مع التقليب المستمر

وتحضر المحاليل العيارية لضبط الـ pH بحساب عدد جرامات المادة (أيدروكسيد البوتاسيوم أو حامض الأيدروكلوريك) فى ١٠٠ مل من المحلول، وهى تعادل الـ minimum assay للمادة (٪) × كثافتها النوعية

ويلى ذلك حساب العيارية، وهى عدد جرامات المادة فى اللتر/الوزن المكافئ

أما الوزن المكافئ فهو يساوى الوزن الجزيئى/الحموضة أو القاعدية

وفى حالة حامض الأيدروكلوريك فإن الـ minimum assay = ٣٥٫٤٪، والكثافة النوعية = ١٫١٨، وبالتالى فإن عدد جرامات حامض الأيدروكلوريك فى ١٠٠ مل = ٣٥٫٤ × ١,١٨ = ٤١٫٧٧ جم.

أما الوزن المكافئ لحامض الأيدروكلوريك فهو: ٣٦٫٤٦/١ = ٣٦٫٤٦

وبذا يحضر محلول ١ عيارى من حامض الأيدروكلوريك بأخذ حجم قدرة = ٤١٧٫٧ ÷ ٣٦٫٤٦؛ أى ١١,٥ مل وإكماله بالماء إلى لتر واحد

ويلى ضبط الـ pH إكمال المحلول إلى حجمه النهائى

يتراوح الـ pH المناسب للنمو الخلوى فى البيئات بين ٥٠، و ٦٠، علمًا بأن النمو والتطور الطبيعيين يتوقفان عندما يكون الـ pH أعلى عن ٧٠ أو أقل من ٤٥ وتجدر الإشارة إلى أن عملية تعقيم البيئات فى الأوتوكليف تؤدى إلى خفض الـ pH بمقدار ٣٠-٠,٥ وحدة. وإذا حدث انخفاض شديد فى pH البيئة أثناء الزراعة (تصبح البيئة سائلة) فإنه يتعين تجديدها، علمًا بأن ذلك الانخفاض قد يصل إلى ٠,٥ وحدة pH هذا وتؤدى زيادة الـ pH عن ٦٠ إلى جعل البيئة صلبة أكثر مما ينبغى، بينما يؤدى انخفاضها إلى عدم تصلبها بشكل جيد (عن Chawla ٢٠٠٠).

إضافة الآجار والتعقيم

يلى ضبط الـ pH إضافة الكمية المطلوبة من الآجار (مثلا . ٦-٨ جم/لتر) أو أى مادة مماثلة يسخن المحلول مع التقليب إلى حين ذوبان الآجار، ويعرف تمام الذوبان بأن يصبح المحلول تام الشفافية

يلى ذلك توزيع البيئة فى أوعية من الزجاج أو البولى بروبلين، ثم يحكم إغلاقها بالقطن أو برقائق الألومنيوم

تعقم بيئة الزراعة فى الأوتوكليف لمدة ٢٠ دقيقة على ١٢١°م تحت ضغط ١٥ رطل على البوصة المربعة (١٠٥ كيلو بسكال).

وإذا ما رغب فى إضافة هرمونات أو مركبات أخرى معقمة بالترشيح، فإنها تضاف مباشرة إلى البيئة المعقمة فى الأوتوكليف

تُبرد البيئة فى حجرة عزل laminar airflow على ٥٠-٦٠°م، وتضاف الهرمونات من خلال مرشح millipore، أو أى مرشح آخر ذات ثقوب بقطر ٠,٢٢ ميكروميتر.

وبعد التبريد يفضل حفظ البيئة على حرارة ٤-١٠°م، مع تفضيل استعمالها بعد نحو ٣-٤ أيام من تحضيرها حتى يمكن تحديد ما إن كانت قد عقمت بصورة جيدة أم لا، حيث تظهر نموات الكائنات الملوثة للبيئات المعقمة جيدًا — خلال تلك الفترة؛ ويتعين حينئذٍ التخلص من تلك البيئات (عن Chawla ٢٠٠٠)

أنواع مزارع الأنسجة

تقسم مزارع الأنسجة tissue culture إلى الأنواع التالية

١ - مزارع البذور seed culture ·

ترجع أهمية مزارع البذور إلى ضرورة استعمالها عندما تؤخذ الأجزاء النباتية المستعملة فى مزارع الأنسجة (الـ explants) من نباتات تُنتج فى البيئات، وكذلك عند إكثار الأوركيد orchid

٢ - مزارع الأجنة embryo culture.

٣ — مزارع الخلايا cell culture

٤ — مزارع الكالس callus culture.

٥ — مزارع الأعضاء organ culture . وهى قد تكنى باسم العضو المزروع، مثل.

أ — مزارع الميرستيم meristem culture.

ب — مزارع القمة الخضرية shoot tip culture

جـ — مزارع الجذور root culture.

د — مزارع النيوسيلة nucellus culture.

هـ — مزارع الإندوسبرم endosperm culture

ز — مزارع البويضات ovule culture.

حـ — مزارع المبايض ovary culture

ط — مزارع حبوب اللقاح pollen culture.

ى — مزارع المتوك anther culture.

٦ — مزارع البروتوبلاست protoplast culture.

الجزء النباتى المزروع والزارعة

الجزء النباتى المزروع (الـ explant)

يطلق اسم explant على أى قطعة من النسيج النباتى يتم فصلها من النبات الأصلى لأجل زراعتها فى بيئة الزراعة فى مزارع الأنسجة

ويتأثر اختيار الجزء النباتى اللازم للزراعة فى البيئات بعديد من العوامل، نوجزها فيما يلى:

١ – عمر النسيج النباتى

من المعروف أن الأنسجة الأصغر عمرًا – فسيولوجيًا – تكون -- بصفة عامة – أكثر استجابة للزراعة فى البيئات الصناعية. وفى كثير من الأحيان لا تكوّن الأنسجة المسنة خلايا كالس قادرة على إعادة التجديد كذلك فإن الأنسجة الأحدث تكون أسهل فى تطهيرها سطحيًّا وأسرع فى نموها واستنباتها بعد زراعتها

٢ - فصل النمو:

نجد أن البراعم أو النموات التى تؤخذ فى فصل الربيع - عندما تكون فى مرحلة النمو القوى – تكون أكثر استجابة للزراعة فى البيئات عن البراعم الساكنة، فالأنسجة الساكنه لا تستجيب للزراعة إلاّ بعد انتهاء حالة السكون فيها كذلك فإن معدلات التلوث تزداد مع تقدم فصل الصيف، وقد تصل إلى ١٠٠٪ فى فصلى الخريف والشتاء

٣ - حجم الجزء النباتى

القاعدة هى أنه كلما كان الجزء النباتى المزروع (الـ explant) أصغر حجمًا كلما ازدادت صعوبة زراعته، حيث يكون من الضرورى تزويد بيئات الزراعة بمزيد من المكونات لنجاح الزراعة، بينما نجد أن الأجزاء النباتية الكبيرة غالبا ما تحتوى على كميات أكبر من الغذاء المخزن بها وهرمونات تساعدها فى نموها فى البيئات الصناعية

٤ – حالة النباتات التى تؤخذ منها الأجزاء التى تستعمل فى الزراعة

يوصى دائما بأخذ الأجزاء النباتية التى تستعمل فى الزراعة من نباتات خالية تماما من جميع الإصابات المرضيه والحشرية ولم يسبق تعرضها لأى شدًّ بيئى

٥ – الهدف من إنتاج مزرعة الأنسجة

نجد - على سبيل المثال – أنه عندما يكون الهدف هو الإكثار الدقيق فإن الـ explant المفضل يكون هو البرعم القمى أو الجانبى أو القمة الخضرية ولأجل إنتاج الكالس يفضل استعمال أجزاء من الفلقات أو السويقة الجنينية السفلى أو الساق أو الأوراق أو الجنين، وتعد أنسجة البادرات الناتجة من البذور المزروعة فى ظروف

معقمة مثالية لأجل إنتاج الكالس. هذا بينما تعد الأنسجة الورقية التي تؤخذ من تلك البادرات النامية في ظروف معقمة هي الأفضل لأجل عزل البروتوبلاست. ولإنتاج نباتات أحادية أو كالس تفضل مزارع المتوك أو حبوب اللقاح

ويبين شكل (٢-٢) مختلف أنواع الأجزاء النباتية (الـ explants التي يمكن استخدامها في مزارع الأنسجة

التطهير السطحي للأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة

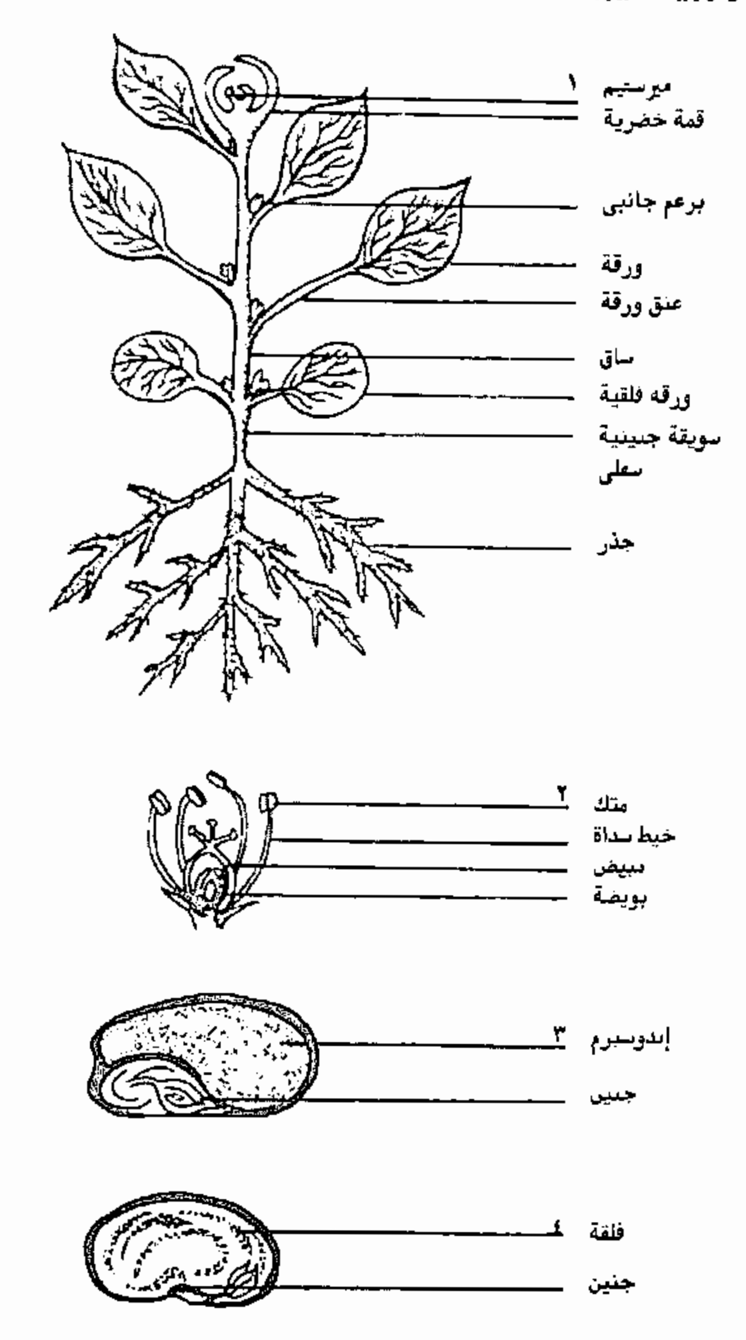
يمكن تلخيص طريقة التطهير السطحي للـ explant المطلوب زراعته، فيما يلي

١ — يغسل الـ explant في ماء دافئ بالصابون، ثم يشطف بماء الصنبور عدة مرات. وتعد هذه الخطوة ضرورية ومفيدة بالنسبة لكل من الساق، والأوراق، والقمة الخضرية، حيث تؤدي إلى التخلص من الملوثات السطحية

٢ - يفيد أحيانًا شطف سريع بالكحول أو مسح النسيج بقطعة من الشاش المبلل بالكحول، وخاصة عندما تكثر الشعيرات بالنسيج أو يكون مغطى بغطاء شمعي سميك

٣ — يشطف الـ explant في محلول من الكلورين القاصر للألوان الذي يستعمل في تبييض الملابس، على أن يحضر المحلول للاستعمال أولا بأول. ويفضل دائمًا إضافة نقطة واحدة أو نقطتان من أي منظف صناعي سائل أو أي مادة مبللة wetting agent، مثل توين ٢٠ tween 20 لكل ١٠٠ مل من محلول التطهير. يحضر محلول التطهير بتركيز ١٠٪ بإضافة ١٠ مل من محلول الكلورين التجاري (مثل الكلوراكس) إلى مخبار زجاجي، وإكمال حجم المحلول إلى ١٠٠ مل. وعندما تجرى عملية التطهير في أنابيب زجاجية يتعين تطهير أغطية الأنابيب كذلك، مع رج محتوى الأنبوبة من الـ explant ومحلول الكلورين برفق على فترات واستمرار ذلك لمدة ٥-٣٠ دقيقة. ونظرا لأن محلول الكلورين يفقد فاعليته بمرور الوقت، لذا .. يلزم دائمًا استعمال تحضيرات جديدة منه.

٤ — يصفى محلول التطهير، وتشطف الـ explant بالماء المعقم ٣-٥ مرات، مع إجراء تلك الخطوة في غرفة عزل hood



شكل (٢-٢) تخطيط يبين مختلف الأجزاء النباتية (**explants** التي يمكن الحصول عليها مــن. (١) النبات، (٢)، الزهرة، (٣) بذرة وحيدة الفلقة، (٤) بذرة ذات فلقتين (عن **Slater** وآخرين ٢٠٠٣).

هذا وتتباين الـ explants فى مدى تحملها لتركيزات محلول الكلورين ومدة التعريض له، وفى مدى الحاجة لزيادة التركيز أو مده التعريض للمحلول فبينما يكفى الأنسجه الرقيقة الغمس لمدة ١٠ دقائق فى محلول كلورين بتركيز ١٠٪، فإن بعض البذور قد تتطلب ٢٠–٦٠ دقيقه فى محلول كلورين بتركيز ٣٠–٥٠٪ ويجب أن نتذكر أن أى سطح نباتى مقطوع مثل السيقان أو الأوراق سوف يُضار من عمليه التعقيم السطحى تلك

ومن أهم المواد لتى تستخدم في التطهير السطحى فى مجال زراعة الأنسجة، ما يلى:

١ -- هيبوكلوريت الصوديوم

يتوفر هيبوكلوريت الصوديوم sodium hypochlorite (وهو NaOCl) فى محلول تبييض الملابس التجارى بنسبة حوالى ٥,٢٥٪ حجم بحجم وعموما يخفف محلول تبييض الملابس بالماء إلى ٥–٢٥٪ حجما بحجم، مع إضافة نقطتين من توين ٢٠ لكل ١٠٠ مل من المحلول المخفف وتتراوح مدة المعامله – عادة – بين ٥، و ٣٠ دقيقه يتبعها السطف بالماء المعقم خمس مرات ويجب تحضير محلول التطهير أولا بأول قبل الاستعمال نظرا لتطاير غاز الكلور منه ويفيد ضبط pH محلول التطهير عند ٧,٠ باستعمال ٥ مولار حمض أيدروكلوريك يفيد ذلك فى تقليل سرعة فقد غاز الكلور منه

٢ -- هيبوكلوريت الكالسيوم

يحضر محلول هيبوكلوريت الكالسيوم calcium hypochlorite [وهو $Ca(OCl)_2$] بتركيز ٨,٠٪ (وزنا بحجم) للتطهير، وذلك بإذابة ٨ جم من المركب فى لتر من الماء مع التقليب لمدة ٥-١٠ دقائق، ثم يترك ليرسب منه ما لم يذوب. ثم يؤخذ الرائق ويضاف له حجم مماثل من الماء، ويضاف إلى المحلول الناتج نقطتان من توين ٢٠، وتعامل به الأنسجة النباتية المطلوب تطهيرها لمدة ٥-٣٠ دقيقة

٣ -- كحول الإثيل أو كحول الأيزوبروبيل

يستعمل أى من الكحولين بتركيز ٧٠٪ حجما بحجم، حيث يمسح بأى منهما

السطح النباتى، كما قد يغمس فيهما الجزء النباتى لمدة دقيقة واحدة إلى خمس دقائق قبل أو بعد تطهيره بهيبوكلوريت الصوديوم.

٤ — فوق أكسيد الأيدروجين:

يعتبر فوق أكسيد الأيدروجين hydrogen peroxide (وهو H_2O_2) مادة مؤكسدة قوية يمكن استعمالها بتركيز ٣-١٠٪ حجم بحجم لمدة دقيقة إلى ثلاث دقائق قبل الشطف بالماء المعقم منفردًا، أو مع المعاملة بالمطهرات الأخرى. هذا .. إلاّ أن التفاعل بين هيبوكلوريت الصوديوم وفوق أكسيد الأيدروجين يعد سامًّا للنسيج النباتى؛ ولذا يتعين شطف النسيج جيدًا بالماء بين معاملتى المركبين.

٥ — غاز الكلورين:

يعد غاز الكلورين فعّالاً فى تطهير البذور الجافة

٦ — داى كلوروأيزوسيانوريت الصوديوم

يعد داى كلوروأيزوسيانوريت الصوديوم sodium dichloroisocyanurate أقل سمية للأنسجة النباتية الحساسة لأى من هيبوكلوريت الصوديوم أو الكالسيوم، ولا يحتاج الأمر إلى شطف النسيج بالماء بعد المعاملة.

هذا .. وتتوفر مركبات أخرى تفيد فى الحد من التلوث، مثل مركب isothiazolone biocide ومضادات الحيوية، مثل الجنتاميسين gentamicin، والأمبسللين ampicillin (عن Smith ٢٠٠٠).

ويعطى جدول (٢-١٤) مزيدًا من المعلومات عن المركبات المستخدمة فى التطهير السطحى للأجزاء النباتية المستعملة فى الزراعة.

تحضين مزارع الزراعة

يتم تحضين مزارع الأنسجة على أرفف فى حجرات خاصة على درجة حرارة ثابتة تتراوح — غالبًا — بين ٢١، و ٢٤°م حسب نوع المزرعة والنوع النباتى المزروع، كما تكون تلك الأرفف مجهزة بلمبات فلورسنتية يمكن عن طريقها التحكم فى شدة الإضاءة التى تعرض لها المزارع، ومدة التعريض اليومية للإضاءة.

هذا وقد استعملت وحدات اللكس lux والقدم شمعه foot candle للتعبير عن شده الإضاءة، إلاّ أن الوحدات الأكثر قبولاً، هى

- الجول Joule/م^2 (J/m^2). وهى تعبير عن الطاقة الإشعاعية radiant energy لكل وحده مساحة
- الواط Watts/م^2 (W/m^2)، وهى تعبر عن الإشعاع irradiance
- الـ photon flux density هى المصطلح المفضل لوصف الطاقة المشعه المؤثرة فى عملية البناء الضوئى photosynthetically active radiation، ويعبر عنها بالـ umol photons/m^2/s، علمًا بأن كل 1 mol من الفوتونات يساوى إينشتاين Einstein (أو E) واحد.

وبذا، فإن وحدة الـ photon flux يمكن التعبير عنها هكذا

1 photon flux density = $uE/m^2/s$

أو بصورة أخرى فإنها تساوى $uEm^{-2}s^{-1}$

تبقى المزارع فى الحضانات إلى أن يتم نقلها إلى أوعية مناسبة للزراعة، الأمر الذى سوف نتناوله بالشرح فى الفصل الخاص بالإكثار الدقيق

تجديد النمو فى المزارع

يعد تجديد النمو regeneration من الأمور الأساسية فى مزارع الأنسجة الناجحة، وإن لم يمكن تجديد النمو بطريقة يمكن الاعتماد عليها والتنبؤ بنتائجها، فإن جميع التقنيات التى تعتمد على ضرورة تكوين ميرستيم عرضى – بما فى ذلك معظم طرق التحول الوراثى – يكون مصيرها الفشل. وعلى الرغم من ذلك، فإنه من المحتمل عدم وجود أى جانب آخر من التقنيات الحيوية أكثر اعتمادًا على التركيب الوراثى مثلما تعتمد خصية تجديد النمو (عن McCown ٢٠٠٣).

إن من أهم الأمور التى يجب الإلمام بها بخصوص عملية تجديد النمو، ما يلى:

١ – تنخفض كفاءة تجديد النمو كلما كان النسيج المستخدم فى الزراعة أكبر عمرا

٢ – تُعد الأجزاء القمية والمحيطية للأشجار والشجيرات هى الأكثر حداثة

٣ -- يفيد السيتوكينين BA (فى كل من النبات الذى يُؤخذ منه الجزء المراد زراعته وفى بيئة الزراعة) فى تسهيل العودة إلى الحداثة، ومن ثم سرعة تجديد النمو (عن Pierik ١٩٩٣)

جدول (٢–١٤) المركبات المستخدمة فى تطهير الأجزاء النباتية المستخدمة فى زراعات الأنسجة (الـ **explants**) قبل زراعتها (عن **Hartmann & Kester ١٩٨٣**).

المركب	التركيز (٪)	مدة المعاملة (دقيقة)	التخلص من بقاياه	ملاحظات
هيبوكلوريت الكالسيوم **calcium hypochorite**	٩–١٠	٥–٣٠	سهل	فعّال جدًا
هيبوكلوريت الصوديوم [1] **sodium hypochlorite**	٢	٥–٣٠	سهل	فعّال جدا
ماء البروم **bromine water**	١–٢	٢–١٠	سهل	فعّال ولكنه قد يكون سامًا للنسيج النباتى
فوق أكسيد الأيدروجين **hydrogen peroxide**	١٠–١٢	٥–١٥	سهل جدا	متوسط الفاعلية
كلوريد الزئبقيق **mercuric chloride**	٠,١–١	٢–١٠	صعب	قد يكون سامًا للنسيج النباتى
مضادات الحيوية **antibiotics**	٤–٥٠ مجم/لتر	٣٠–٦٠	سهل	فعال

(أ) يتوفر فى مستحضرات الألوان التجارية (المبيضات، مثل الكلوراكس) بنسبة ٥,٢٥٪ – عادة – من التحضير التجارى. ويستخدم هذا التحضير – عادة – بنسبة ٢٠٪ حجم إلى حجم (أى جزء تحضير تجارى إلى كل ٤ أجزاء ماء). ولكن تركيز ١٠٪ قد يكفى لإجراء التعقيم المطلوب

ولتوضيح التباين بين الأنواع النباتية فى مدى سهولة تجديد النمو فيها .. نستعرض – فيما يلى – بعض الدراسات فى هذا المجال:

● اختلفت ثلاث سلالات مرباة داخليًا من الخيار فى قدرتها على تجديد نموها (regeneration) فى مزارع الأنسجة، معبرًا عنها بنسبة النبيتات المزروعة explants التى تجدد تكوين كالس جنينى embryogenic callus منها، ومتوسط عدد نباتات المزارع التى نتجت من كل explant تباينت السلالات الثلاث فى قدرتها على تجديد

النمو ما بين ضعيفة، ومتوسطة، وعالية. وأوضحت الدراسات الوراثية أن تلك الخاصية لا تورث سيتوبلازميًا، وأن السلالتين المتوسطة والعالية فى القدرة على التجديد احتوت كل منهما على زوجين من الجينات السائدة اللذان تحكما فى تجديد النمو بالمزارع، وأنهما كانا مكملين لبعضهما البعض complementary، وربما كان بينهما تفاعل إضافى وقد احتوت السلالة ذات القدرة العالية على تجديد النمو على جين ثالث (Nadolska-Orczyk & Malepszy ١٩٨٩).

● تميزت السلالة PI128644 من *L. chilense* بقدرة عالية على تجديد نموها فى مزارع الأنسجة، وأمكن تجديد ثلاث معلمات RAPD كانت على علاقة وثيقة بخاصية القدرة العالية على تجديد النمو، وهى: OPA02-1، و OPA20-3، و inv^{chu} (Takashina وآخرون ١٩٩٨)

● اظهر هجين الكرنب Matsunami أعلى كفاءة فى تكوين الأجنة وفى تجديد النمو من الـ microspores، وذلك من بين ٣٨ تركيبًا وراثيًا تم اختبارها. وتزيد كفاءة هذا الهجين فى تكوين الأجنة بمقدار ٥–١٠ أمثال أصناف الكرنب الأخرى (Kuginuki وآخرون ١٩٩٩).

● أمكن تجديد النمو فى عدد من أصناف الفلفل، وكذلك فى كل من النوعين *Capsicum baccatum*، و *C. praetermissum*، بزراعة الأوراق – أى باستعمال leaf explants – حيث أعطت نموات أكثر مما أعطته زراعة السويقة الجنينية السفلى أو الأوراق الفلقية فى جميع التراكيب الوراثية المستعملة. وقد شكل نوع الجزء النباتى المزروع ٥٦.٣٪ من التباينات التى شوهدت فى معدل تجديد النمو. كذلك أدت إضافة البنزيل أدينين بتركيز ٢٢ ميكرومولار إلى الحصول على أفضل تجديد للنمو (Christopher & Rajam ١٩٩٦).

مشكلة التزجج

يعتبر التزجج – أو التزجيج – vetrification (أو hyperhydricity، و hyperhydration) من العيوب الفسيولوجية disorders التى تظهر على نباتات مزارع

الأنسجة، وفيها تصبح الأوراق نصف شفافة translucent. والسيقان منتفخه، ومشوهة، وهشة (قابلة للكسر). ولا يمكن لهذه النباتات تحمل عملية الشتل فى البيوت المحمية تنشأ هذه الحالة عندما تمتلئ المسافات البينية لخلايا الورقة بالماء بدلاً من الهواء، وغالبًا ما يختفى النسيج العمادى من تلك الأوراق، التى تبدو مجعدة، وتفتقر للتمع الأديمى، وتقل فيها كثيرًا أعداد الثغور. كما أن ما يوجد منه لا يعمل بصورة طبيعية يتباين مدى ظهور تلك الحالة بين الأنواع النباتية، والأصناف، وحتى بين سلالات الصنف الواحد

يمكن إرجاع هذه الحالة إلى عديد من العوامل، منها طريقة تحضير الجزء النباتى المستخدم فى الزراعة (الـ explant)، ومكان وضعه فى بيئة الزراعة، وتركيب بيئة الزراعه، والعوامل البيئية (عن Schloupf وآخرين ١٩٩٥)

مصادر إضافية فى مجال مزارع الأنسجة بصورة عامة

لمزيد من التفاصيل عن مزارع الأنسجة بصورة عامة يراجع ما يلى

المرجع	ملاحظات
Paul (١٩٧٠)	مزارع الخلايا والأنسجة
Sala وآخرون (١٩٨٠)	مزارع الخلايا والأنسجة
Vasil (١٩٨٠)	مزارع الخلايا والأنسجة
Thorpe (١٩٨١)	مزارع الأنسجة وتطبيقاتها فى الزراعة
Reinert & Yeoman (١٩٨٢)	مزارع الخلايا والأنسجة
Mantell & Smith (١٩٨٣)	مزارع الأنسجة
Bhojwani & Razdan (١٩٨٣)	شامل للموضوع
Ammirato وآخرون (١٩٨٤)	عملى يتناول مجموعة من الأنواع المحصولية كل منها منفرده
Dixon (١٩٨٥)	مزارع الخلايا
Dixon & Gonzales (١٩٩٤)	شامل لكل من الأسس العامة والجوانب العملية
Scragg (١٩٩٨)	إنتاج مزارع الأنسجة على النطاق الواسع بهدف الإنتاج التجارى للمركبات التى تنتجها تلك المزارع

المرجع	ملاحظات
Smith (٢٠٠٠)	مرجع عملى شامل ومختصر
الرفاعى والشويكى (٢٠٠٢)	يتناول مزارع الأنسجة من كافة الوجوه
Trigiano & Gray (٢٠٠٥)	التكنولوجيا الحيوية – وخاصة مزارع الأنسجة – وتطبيقاتها

الفصل الثالث

مزارع الخلايا

عزل الخلايا المفردة وزراعتها

يُعد عزل خلايا مفردة (شكل ٣-١) أولى الخطوات في عمل مزارع الخلايا Cell Cultures. وتجرى هذه الخطوة إما بالوسائل الميكانيكية، وإما إنزيميًا من الأعضاء النباتية الكاملة، وإما تؤخذ الخلايا من نسيج كالس callus tissue نامٍ من أسطح معقمة لأجزاء نباتية مزروعة. ويلي ذلك .. زراعة الخلايا من المعلق.

وتعد طريقة برجمان Bergmann (شكل ٣-٢) أكثر الطرق شيوعًا لزراعة الخلايا المفردة، ويراعى فيها أن يكون تركيز الخلايا المفردة في البيئة السائلة ضعف التركيز النهائي المطلوب عند الزراعة.

كما يوضح شكل (٣-٣) تقنية النسيج المغذى nurse-tissue technique لتنمية مستعمرات من الخلايا المفردة، ويوضح شكل (٣-٤) خطوات تقنية غرف النمو الدقيقة microchamber technique لزراعة الخلايا المفردة.

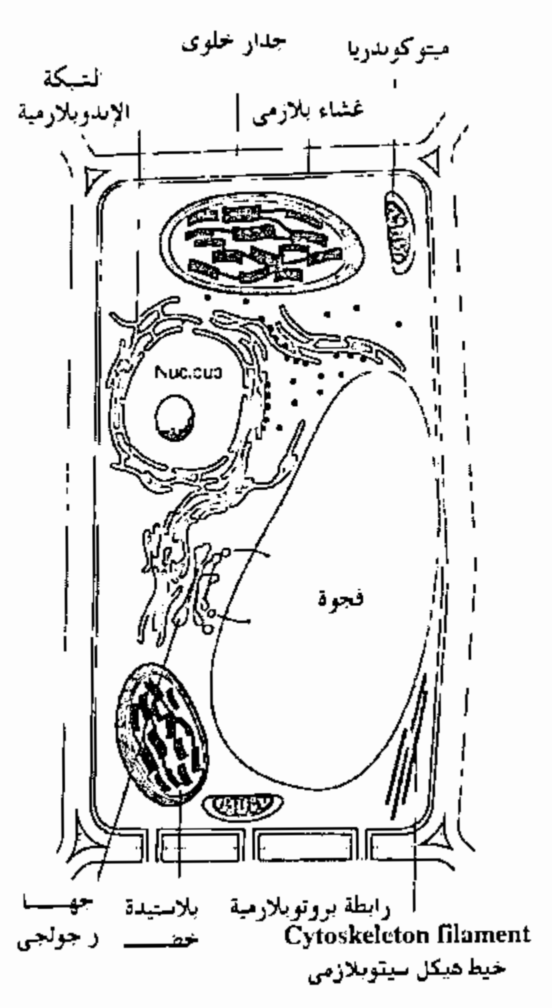
ويبين شكل (٣-٥) إنتاج نبات تبغ من خلية مفردة

بيئات مزارع الخلايا

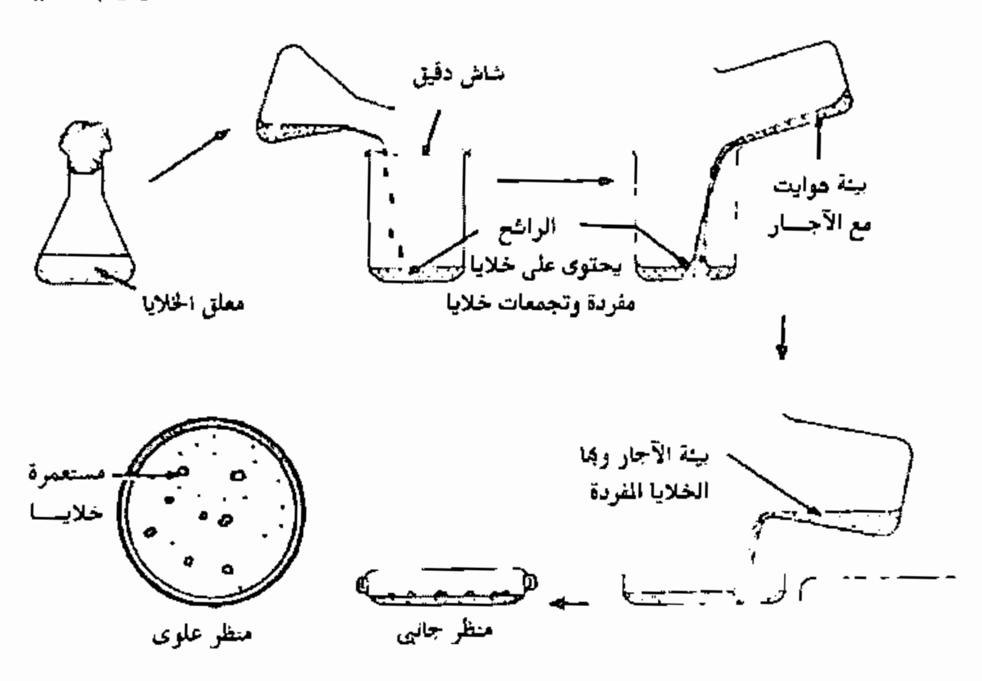
تتوقف طبيعة النمو في مزارع الخلايا على تركيز الهرمونات في بيئة النمو، حيث قد يكون النمو متميزًا Differentiated، أو غير متميز Undifferentiated. ويُعنى بالنمو المتميز تكوينه لنموات خضرية، أو جذور، أو كليهما، بينما يُعنى بالنمو غير المتميز تكوينه لكتلة من الخلايا تسمى كالس Callus.

ينتج الكالس – عادة – من أي نسيج نباتي متميز (مثل الأوراق، والسيقان والجذور)، بوضع الجزء النباتي الذي تؤخذ منه الخلايا (explant) في بيئة تحتوى على تركيز مرتفع نسبيًا من الأوكسين، وتركيز منخفض نسبيًا من السيتوكينين، حيث

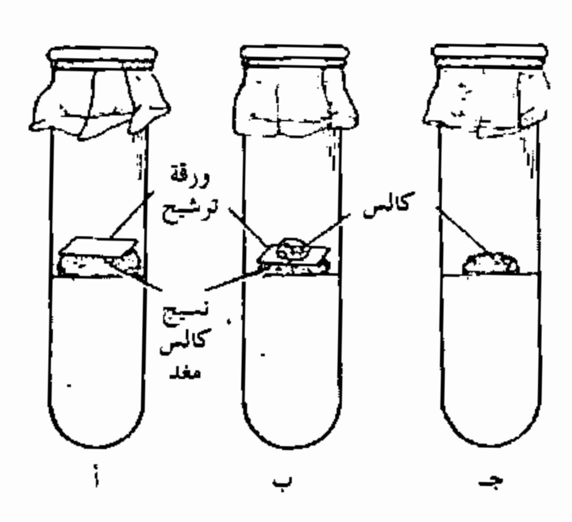
يتكون الكالس حينئذ، ويمكن أن يستمر فى النمو بعد ذلك، إما على صوره كتل متعددة الخلايا multicellular masses فى البيئات الصلبة، وإما على شكل تجمعات صغيرة من الخلايا small cell aggregates فى البيئات السائلة الدوارة (أى التى توضع على أجهزة تتحرك بأوعيه اهتزاز حركة دورانية) ومع استعمال تركيزات مرتفعة من السيتوكينينات وتركيزات منخفضة من الأوكسينات فى بيئة النمو فإنه يمكن – أحيانا – تحفيز تكوين نموات متميزة إلى سيقان وأوراق وجذور، أو تكوين أجنه عرضية تنمو بدورها إلى نباتات كاملة بعد ذلك



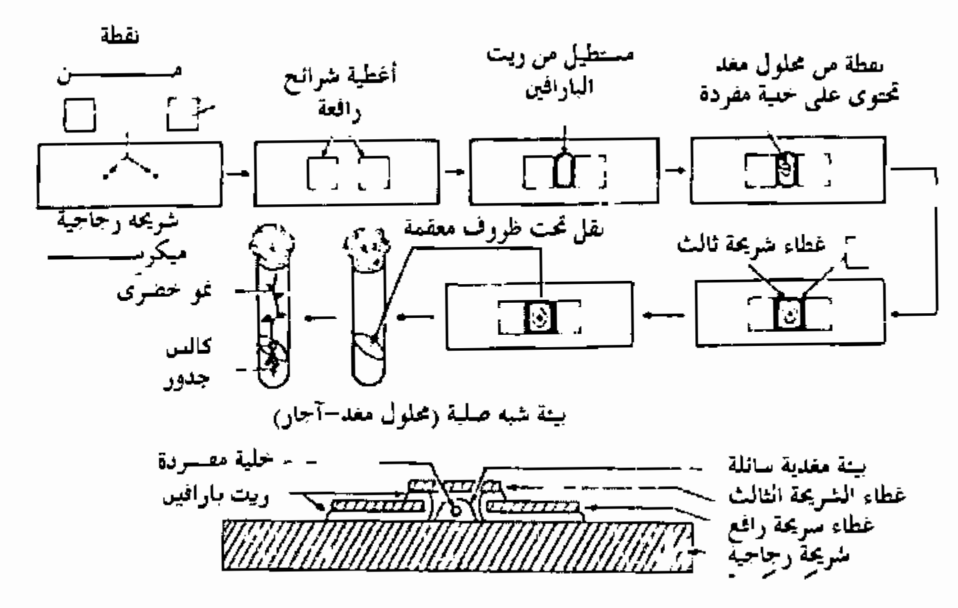
شكل (٣–١): خلية نباتية.



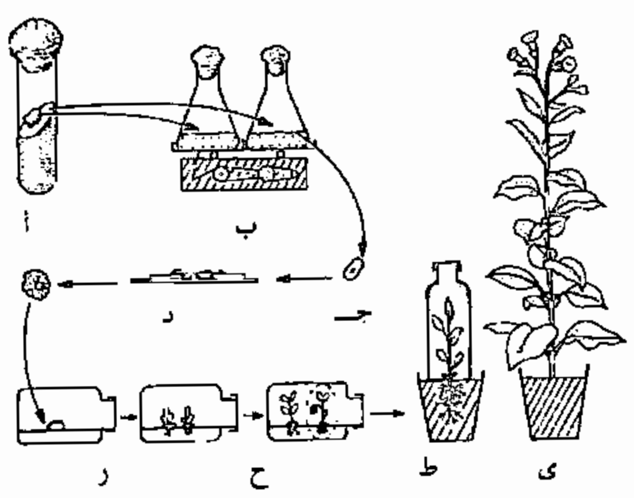
شكل (٣-٢): طريقة **Bergmann** لزراعة الخلايا المفردة.



شكل (٣-٣): تقنية النسيج المغذى **nurse-tissue technique** لتمية مستعمرات من الخلايا المفردة. (أ) وضعت خلية مفردة من كالس على ورقة ترشيح تستند على كتلة من الكالس (النسيج المغذى). (ب) حدث انقسام بالخلية وكونت نسيجًا صغيرًا. (جـ) نمت كتلة من الكالس بعد نقل ناتج الانقسام الأولى للخلية المفردة من على ورقة الترشيح إلى بيئة الزراعة مباشرة.



شكل (٣-٤) خطوات تقنية غرفة النمو الدقيقة microchamher technique لزراعة الخلايا المفردة



شكل (٣-٥): تكوين نبات تبغ من خلية مفردة. (أ) كالس نامٍ من قطعة صغيرة من النبات أخذت من النخاع، (ب) عملية نقل قطعة صغيرة من الكالس إلى بيئة سائلة فى دوارق زجاجية ووضعها على هزاز، (جـ) تفكك الكالس إلى خلايا مفردة، (د) نقل الخلية المفردة جـ من الدورق ووضعها فى نقطة من بيئة الزراعة فى حيز صغير خاص microchamber، (هـ) نسيج صغير تكون من الخلية المفردة من خلال عدة انقسامات متتالية، (و) عملية نقل النسيج هـ إلى بيئة شبه صلبة حيث ينمو إلى كالس كبير، (ز،حـ) تميز النباتات، (ط، ى) نمو النباتات إلى مرحلة النضج عند نقلها إلى أصص

ونقدم – فيما يلي تركيب بيئتين مناسبتين لزراعة خلايا مفردة مـن النسـيج الوسـطى (الميزوفيل) للورقة

البيئة والكميات (مجم/لتر)		
Joshi and Ball	Rossini	المكونات
—	٩٥٠	KNO_3
٧٥٠	—	KCl
—	٧٢٥	NH_4NO_3
٦٠٠	—	$NaNO_3$
٢٥٠	١٨٧	$MgSO_4.7H_2O$
—	١٦٩	$CaCl_2$
١١٢	—	$CaCl_2.6H_2O$
—	٦٩	KH_2PO_4
١٤١	—	$NaH_2PO_4.2H_2O$
٥,٣٥	—	NH_4Cl
—	١٢,٥	$MnSO_4.4H_2O$
٠,٠٣٦	—	$MnCl_2.4H_2O$
٠,٠٥٦	٥	H_3BO_3
—	٥	$ZnSO_4.4H_2O$
٠,١٥	—	$ZnCl_3$
٠,٠٢٥	٠,١٢٥	$NaMoO_4.2H_2O$
—	٠,٠١٢٥	$CuSO_4.5H_2O$
٠,٠٥٤	—	$CuCl_2.2H_2O$
٠,٠٢	—	$CoCl_2$
—	١٣,٩	$FeSO_4.7H_2O$
٠,٥	—	$FeCl_3.6H_2O$
—	١٨,٦	Na.EDTA
٠,٨	—	Disodium salt of ethylene dinitrilotetraacetic acid
—	٢	Glycine
—	٥	Nicotinic acid
—	٠,٥	Pyridoxine HCl
—	٠,٥	Thiamine HCl
—	٠,٠٥	Biotin
—	٠,٥	Folic acid
٤٠٠	—	Casein hydrolysate (acid hydrolysate, acid and vitamin free)
—	١٠٠	m-Inositol
—	٠,١	BAP
٠,١	—	Kinetin
١	١	2,4-D
٢٠٠٠٠	١٠٠٠٠	Sucrose
؟	٥,٠	pH

ولمزيد من التفاصيل عن مزارع الخلايا والتميز منها . يراجع Helgeson (١٩٨٠)، و Evans وآخرون (١٩٨١)

الفصل الرابع

مزارع البروتوبلاست

مقدمة

تُعد مـزارع البروتوبلاسـت protoplast culture (وهـى مـزارع للخلايـا بـدون جـدرها السيلولوزية) – وما يترتب عليها من تكوين لهجن جسمية – من أكثر التقنيات الحيوية حاجة لظروف واحتياجات خاصة لنجاحها. وقد أثارت تلك التقنيات اهتمـام الكـثيرين خلال سبعينيات وثمانينيات القرن الماضى، ولكنهـا أفلَتْ بعـد تطـور تقنيـات التحـول الوراثى.

لقد عرفت مزارع البروتوبلاسـت كوسيلة لإنتاج نباتـات كاملـة منهـا بفضـل دراسـات Takebe وآخرين التى نشرت عام ١٩٧١ ومنذ ذلك الحين .. حدث تقدم هائل فى هذا المجال، وأمكـن تجديـد نمـو عديـد مـن المحاصيل الزراعيـة الهامـة – مثـل الموالح، والكمثـرى، والبطـاطس، والطمـاطم، والتبـغ، والأرز، والبرسـيم الحجـازى، والـذرة، والخيار، والباذنجان، والخس، والكرنبيات – أمكن تجديد نموهـا بصـورة روتينيـة مـن مزارع البروتوبلاسـت، الأمر الذى مهد الطريق لدراسات دمج البروتوبلاسـت.

يمكن عن طريق تلك التقنية الحصول على ملايـين البروتوبلاسـتات فـى طبـق بـترى واحـد بتحضـين الأنسـجة النباتيـة مـع الإنزيمـات المحللـة للجـدر الخلويـة. وتفصـل البروتوبلاستات من مختلـف الأجـزاء النباتيـة كالجـذور، والسـويقة الجنينيـة السـفلى، والفلقات، وعقد الرايزوبيم الجذرية، والأوراق، والثمار، وبتلات الأزهار، والإندوسـبرم، والخلايا الأمية لحبوب اللقاح، والكالس، ومزارع معلقات الخلايا. ومن بين تلك الأجزاء النباتية، تُمثل الأوراق ومزارع معلقات الخلايا أهم المصادر للحصول علـى محصـول عـالٍ من البروتوبلاستات فى أنواع عديدة من النباتات.

ولعزل البروتوبلاستات يحضن النسيج مع مخلوط من إنزيمـات تقـوم بتحليـل الجـدر

الخلوية ويتكون من السليوليز cellulase (بتركيز ٠٫٢–٥٪)، وبكتينيز pectinase (بتركيز ٠٫٥–١٪) لمدة ٥-١٠ ساعات على ٢٥°م يمرر ناتج عملية التحلل الإنزيمى خلال مناخل تتراوح سعة ثقوبها بين ٣٠، و ٤٠ ميكروميتر للتخلص من الأنسجة غير المهضومة، ثم تجمع البرونوبلاستات فى محلول ملحى ذات ضغط أسموزى مناسب

ويتطلب نجاح زراعة البروتوبلاست توفر بيئة نمو خاصة تسمح بتكـنره، ثم بتميز نباتات كاملة منه

ويتم دمج البروتوبلاستات protoplasts إما كهربائيًا (بإحداث صدمة كهربائية)، وإما كيميائيًا (باستعمال البوليثيلين جليكول PEG على سبيل المثال)، وإما بطرق أخرى عديدة

ولقد أمكن عن طريق تلك التقنية دمج بروتوبلاستات عديد من الأجناس النباتية، مثل *Citrus*، و *Lycopersicon*، و *Nicotiana*، و *Solanum*، كما دمجت بروتوبلاستات أنواع نباتية تنتمى لجنس واحد، وأحيانا دمجت بروتوبلاستات أنواع تنتمى لأجناس مختلفة، وفى أحيان ثالثة دمجت نواة أحد الأنواع فى سيتوبلازم نوع آخر لإنتاج ما يعرف باسم الهجين السيتوبلازمى cytoplasmic hybrid، أو cybrid

ومن أكبر المشاكل التى واجهت تهجين البروبوبلاستات وحدَّت من الاستفادة من تلك التقنية المتطلبات الكثيرة لتداول الخلايا، والتغير فى مستوى التضاعف، والحاجة إلى برامج تربية واسعة ومكثفة بعد الدمج (عن McCown ٢٠٠٣)

ويتوقف نجاح زراعة البروتوبلاست وتجديد نمو نباتات كاملة منه على عديد من العوامل، من أهمها ما يلى:

١ — التركيب الوراثى للنبات المستعمل.

٢ — النسيج المعزول منه البروتوبلاست

٣ — الظروف الفسيولوجية التى تتعرض لها مزارع البروتوبلاست.

٤ — مدى نقاوة الإنزيمات المستخدمة.

٥ — الضغط الأسموزى للبيئة

٦ — فترة الحضانة.
٧ — بيئة الزراعة ومحتواها من منظمات النمو
٨ — كثافة الزراعة.
٩ — نوع البيئة (صلبة أم سائلة).
١٠ — ظروف الحضانة

تجهيز البروتوبلاستات وزراعتها

تعد الأوراق حديثة التكوين أفضل مصادر الخلايا لمزارع البروتوبلاست يُطَّهر النسيج النباتي المستعمل سطحيًّا، ثم تسلخ بشرة الورقة، أو يقطع الجزء النباتي المستخدم إلى أجزاء صغيرة، قبل وضعه فى محلول الإنزيمات الهاضمة للجدر الخلوية. وتفضل أن تكون المعاملة بالإنزيمات الهاضمة تحت تفريغ، لإسراع عملية تخلل محلول الإنزيمات بين الخلايا كما يفيد — أيضًا — تحريك الأنسجة المعاملة بوضعها فى جهاز هزاز فى أثناء المعاملة. وتتراوح فترة المعاملة بالإنزيمات من نصف ساعة إلى ٢٠ ساعة.

مصادر البرونوبلاستات وإعدادها للاستعمال

تؤخذ الأوراق التى تستخدم فى تجهيز مزارع البروتوبلاست من نباتات قوية النمو وخالية من الأمراض تنمو فى ظروف رطوبة عالية وإضاءة منخفضة. ويفضل استعمال الأوراق المكتملة التكوين التى بدأت فى التصلب قليلاً، وذلك من البادرات، أو من النموات فى النباتات الأكبر سنًا، كما يجب ألاّ يكون بها أى متبقيات من المبيدات.

وعند سلخ الأوراق يجب استعمال مشرط حاد، مع تجنب إجراء القطع قريبًا من العروق الكبيرة فى الأوراق الكبيرة الأكثر تكوينًا.

يفيد تعريض النسيج الورقى المستخدم لتفريغ قدره ١٠٥ إلى ١٤٠ كيلوباسكال لمدة ١٥—٢٠ دقيقة أثناء تشريبها بالإنزيمات فى زيادة اختراق الإنزيمات للأنسجة، علمًا بأن الأوراق ذات النسيج البرانشيمى المندمج قد تتطلب التعريض للتفريغ لفترة أطول.

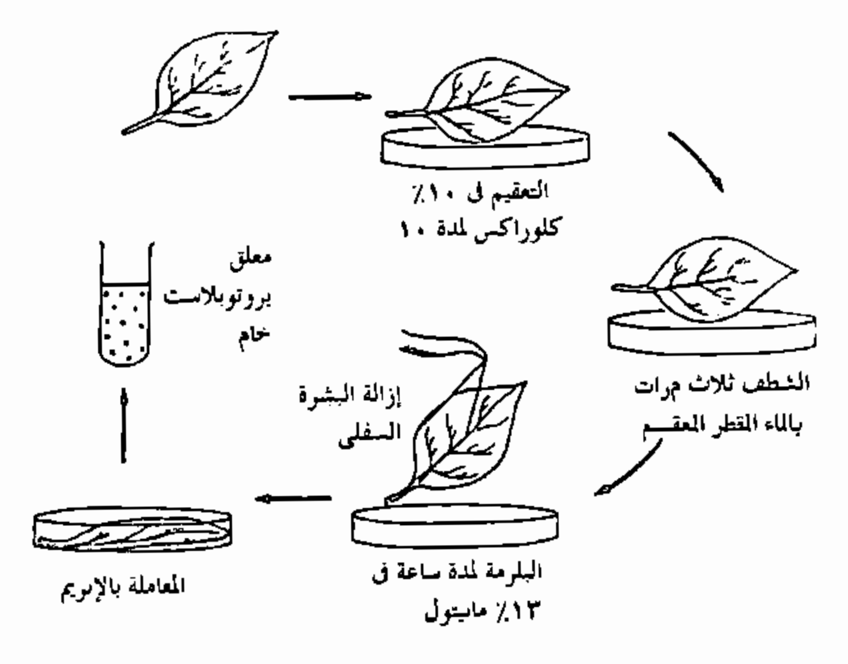
أما مزارع الكالس أو معلقات الخلايا التى تستعمل فى عزل البروتوبلاست فإنها

يجب أن تكون فى مرحلة النمو اللوغاريتمى وقت عزلها، علمًا بأن النسيج الذى يسهل سحقه وتقنيته (الذى يكون friable)، والأقل محتوى من النشا . يعطى أفضل النتائج (عن Grosser ١٩٩٤)

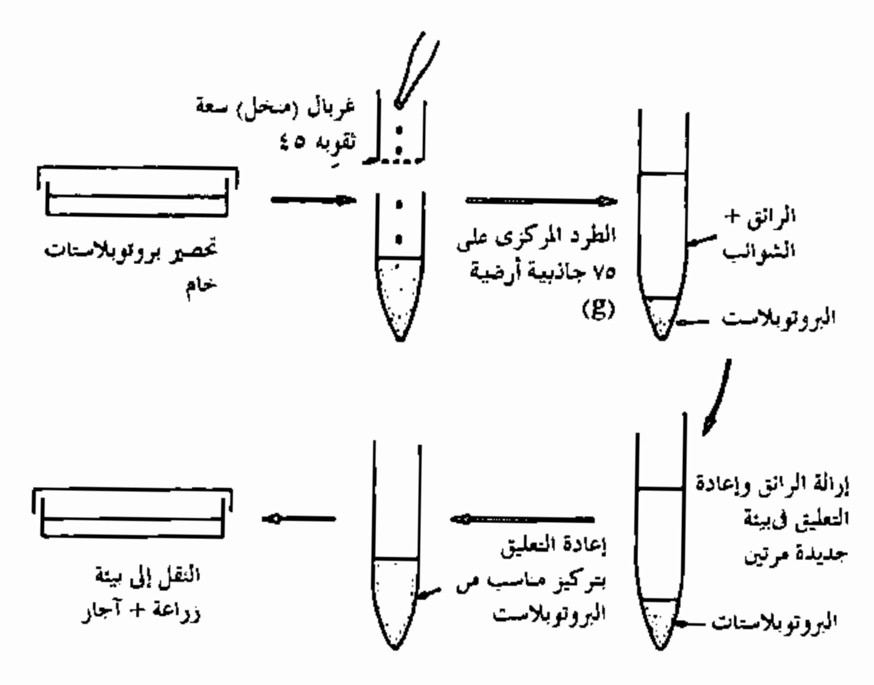
تحضير البروتوبلاست الخام وتنقيته

يفصل الجدار الخلوى السيليلوزى عن البروتوبلاست بسهولة؛ بواسطة إنزيم السليوليز cellulase الذى يحضر من مزارع الفطر *Myrothecium verrucaria* وقد ظهرت منذ عام ١٩٦٨ تحضيرات تجارية من إنزيمى ماسيروزيم macerozyme، وسليوليز. واستخدمت بتعريض قطع من النسيج النباتى للإنزيم الأول — ماسيروزيم — لفصل الخلايا عن بعضها، ثم إضافة الإنزيم الثانى — سليوليز — لهضم الجدر الخلوية، ولكن تفضل إضافتهما معا فى آن واحد.

ويبين شكل (٤-١) طريقة عزل البروتوبلاست الخام. بينما يبين شكل (٤-٢) طريقة تنقية هذا البروتوبلاست الخام (عن Dodds ١٩٨٥).



شكل (٤-١): تخطيط يوضح طريقة عزل البروتوبلاست الخام



شكل (٤-٢): تخطيط يوضح طريقة تنقية البروتوبلاست الخام.

يُنقّى البروتوبلاست بالترشيح على فلاتر من الصلب غير القابل للصدأ أو من النيلون، تكون ذات ثقوب بقطر ٤٥ ميكروميتر، هذا .. علمًا بأن المتبقيات الصلبة particulate debris التى تفصل عن البروتوبلاست بالترشيح تخفض من كل من pH البيئة، وحيوية البروتوبلاست، ومعدلات الدمج. ولأجل تقليل تلك المشكلة، يستعمل مُدرَّج gradient، مثل ٢٥٪ سكروز . ١٣٪ مانيتول (عن Grosser ١٩٩٤).

ونوضح فى جدول (٤-١) الظروف المثلى التى تلزم لعزل بروتوبلاست نوعين نباتيين

الإنزيمات المستعملة فى هضم الجدر الخلوية

يتضمن عزل البروتوبلاست بطريقة هضم الجدر الخلوية استعمال إنزيمات السيليوليز cellulase والهيميسيليوليز hemicellulase، والبكتينيز pectinase، وهى التى يُتحصل عليها من مصادر مختلفة، مثل: الفطريات، والقواقع (الحلزونات)، ومعى النمل

الأبيض تتوفر هذه الإنزيمات تجاريًا بتحضيرات مختلفة على درجات متباينة من النقاوة. يجرى الهضم بتوافيق مختلفة من تلك الإنزيمات في pH يتراوح بين ٥٫٥ و ٥٫٨ لمدة ٣–١٨ ساعة. وبعد ذلك تُجمع البروتوبلاستات وتنقى بالطرد المركزى لفصلها عن بقايا الخلايا (عن Verlleux وآخرين ٢٠٠٥).

جدول (٤–١) الظروف المثلى لعزل بروتوبلاستات نوعين نباتيين (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

المادة أو الظروف أو العملية	مزرعة خلايا تبغ	خلايا النسيج الوسطى للنجيليات
المادة النباتية	مزرعة مجددة بعمر ٤–٥ أيام	بادرات بعمر ٥–٦ أيام
Cellulase	Onozuka R-10 ٪١	Cellulysin ٪٢
Macerozyme	Onozuka R10 ٪٠٫٢–٠٫١	٪٠٫٥
Hemi-cellulase	—	٪١
pH المحلول الإنزيمى	٤٫٧ أو ٥٫٧	٥٫٤–٤٫٦
حجم المحلول الإنزيمى/الوزن الطازج للنسيج	١٠ مل/جم	١٠ مل/جم
فترة الحضانة	٢–٣ ساعة	٢ ساعة
حرارة التحضين	٢٢–٣٧°م	٢٠–٢٥°م
معدل الرج الدورانى	٥٠ دورة/دقيقة	٨٠ دورة/دقيقة
المنظم الإسموزى	٣٠٠–٨٠٠ مللى مانيتول/لتر	٦٠٠ مللى مول سوربيتول/لتر

هذا ويجب استخدام أفضل التحضيرات الإنزيمية من بين تلك المستخدمة فى تحرير البروتوبلاستات من الجدر الخلوية، مثل الـ cellulases، والـ macerases، والـ pectolyases، حيث إنها تسرع من تحرير البروتوبلاست وتقلل من تعرضه للملوثات الضارة وربما يقلل خلط محاليل الإنزيمات مع بيئة البروتوبلاست من الشدّ الذى يتعرض له البروتوبلاست أثناء عزله؛ وبذا تزداد حيويته

ويعطى جدول (٤–٢) أمثلة لبعض مخاليط الإنزيمات، والـ pH، والمحاليل الأسموزية التى استخدمت فى عزل بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية.

جدول (٤–٢): أمثلة لبعض مخاليط الإنزيمات، والـــ pH، والمحاليل الإسموزية التى استخدمت فى عزل بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية (عــن Mantell وآخرين ١٩٨٥).

النوع النباتى	الجزء النباتى المستعمل	مخلوط الإنزيمات (وزن/حجم)	الـ pH	المحلول الإسموزى
Nicotiana tabacum var. Xanthi	Leaf (mesophyll)	4% Meicelase		
	Cell suspensions	0.4% Macerozyme	5.8	13% Mannitol (0.71 M)
		2% Driselase		
		2% Cellulase		
		0.5% Macerozyme		Seawater
	Leaf (mesophyll)	2% Cellulase		
		0.5% Macerozyme		
N. sylvestris	Leaf (mesophyll)	0.1% Cellulase		Seawater
		0.02% Macerozyme	5.8	8% Mannitol (0.44 M)
Solanum tuberosum cv. Bintje	Axenic shoots	1.5% Cellulase		
		0.3% Macerozyme	5.5	0.6 M Mannitol
Macleaya spp.	Leaf (mesophyll)	0.2% PATE		
		0.5% Cellulase	5.6	0.5 M. Mannitol
Medicago spp.	Leaf (mesophyll)	2% Rhozyme		
		4% Meicelase		
		0.3% Macerozyme	5.6	13% Mannitol (0.71 M)
Phaseolus aureus	Roots	2% Rhozyme		
		4% Meicelase		
		0.3% Macerozyme	5.6	13% Mannitol (0.71 M)
Trigonella spp.	Cell suspensions	2% Rhozyme		
		4% Meicelase		
		0.3% Macerozyme	5.6	13% Mannitol (0.71 M)

ويبين جدول (٤-٣) عددًا من التحضيرات التجارية للإنزيمات المستعملة فى هضم الجدر الخلوية وأمكن بواسطة هذه الإنزيمات فصل البروتوبلاست عن الجدار الخلوى فى أية خليه نبتية ثم تتلجنن جدرها، أيًا كان النسيج الذى أخذت منه، ويعد إنزيم بكتنيز pectinase ضروريًا لتحليل الصفيحة الوسطى وفصل الخلايا عن بعضها (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

جدول (٤-٣) بعض الإنزيمات المتوفرة تجاريًا، والتى تستخدم فى عزل البروتوبلاست (عن Bohjwani & Razdan ١٩٨٣)

الإنزيم	الكائن المنتج للإنزيم
Cellulase R-10	*Trichoderma viride*
Meicelase-P	*Trichoderma viride*
Hemicellulase H-2125	*Rhizopus* sp.
Macerozyme R-10	*Rhizopus* sp.
Pectinase (purified)	*Aspergillus niger*
Pectolyase Y23	*Aspergillus japonicus*
Pectinol	*Aspergillus* sp.
Zymolyase	*Arthrobacter luteus*
Driselase	*Irpex lactes*

ومن بين التحضيرات الإنزيمية التجارية الأخرى الـ helicase، والـ cellulysin، والـ rhozyme

هذا ويجب تحديد جودة التحضيرات الإنزيمية، والكميات التى يتعين استخدامها منها، والمدة التى تلزم تعريض البروتوبلاست لها. والتركيز المناسب من المركبات التى تستخدم فى التحكم الأسموزى (osmoticum) تحديد كل ذلك تجريبيًا

هذا مع العلم بأن زيادة التعرض للإنزيمات قد يضعف الأغشية البروتوبلازمية ويقلل حيوية البروتوبلاست ويمكن أحيانًا تقليل الإضرار بالبروتوبلاست بزيادة تركيز الـ osmoticum ويفيد الرج الهادئ باستعمال رجّاج دوار على سرعة بطيئة (٢٥-٥٠ دورة فى الدقيقة) فى تحرير البروتوبلاستات ويفضل إجراء عملية عزل البروتوبلاست فى الظلام على حرارة ٢٥-٢٨°م، وهى الظروف التى تسمح بزيادة نشاط الإنزيمات، مع

الاحتفاظ بحيوية البروتوبلاستات، علما بأن البروتوبلاستات تعد حساسة للضوء (عن Grosser ١٩٩٤)

بيئات مزارع البروتوبلاست

تتشابه بيئات مزارع البروتوبلاست مع بيئات مزارع الخلايا إلى حد كبير، وتفضل البيئات السائلة، مع مراعاة الدقة فى ضبط الضغط الإسموزى للبيئة ويبين جدول (٤-٤) تركيب إحدى البيئات لزراعة البروتوبلاست

هذا ويستخدم فى مزارع البروتوبلاست الآجاروز agarose بدلاً من الآجار الذى يستخدم فى النوعيات الأخرى من مزارع الأنسجة. ويعتبر الآجاروز بمثابة آجار منقى أزيلت منه إسترات الكبريتات sulphate esters، ومن ثم تقل فيه الشحنات السالبة كثيرا عما فى الآجار

ومن أهم مميزات الآجاروز – مقارنة بالآجار – ما يلى:

١ – تنخفض درجة ذوبان الأجاروز مقارنة بالآجار، وبالتالى تقل فرصة الإضرار بالبروتوبلاست

٢ – تكون كفاءة عملية الزراعة أعلى.

٣ يبقى البروتوبلاست فى وضع ثابت، وبالتالى يكون من الأسهل ملاحظته

٤ – لا يحدث تجمع وتكتلات للبروتوبلاست بدرجة حدوث ذلك على الآجار، وبالتالى يكون من الأسهل إجراء عملية انتخاب وإكثار البروتوبلاستات المفردة

تحضين المزارع وتجديد النمو

تجب زراعة البروتوبلاست بطريقة تسمح بأكبر قدر من التبادل الغازى، وذلك بجعلها إما فى طبقة رقيقة، وإما فى بيئة شبه صلبة، وإما فى طبقة رقيقة من بيئة سائلة. ويتعين إحكام إغلاق المزارع التى تم فيها دمج البروتوبلاست لتجنب جفافها، وخاصة بالنسبة للبيئات التى تحتوى على المانيتول، والتى تكون أكثر تعرضًا للجفاف.

جدول (٤-٤): بيئة لزراعة البروتوبلاست (عن Bhojani & Razdan ١٩٨٣).

المكونات	الكمية (مجم/لتر)	المكونات	الكمية (مجم/لتر)
Mineral salt			
NH_4NO_3	600	KI	0.75
KNO_3	1900	H_3BO_3	3.00
$CaCl_2.2H_2O$	600	$MnSO_4.H_2O$	10.00
$MgSO_4.7H_2O$	300	$ZnSO_4.7H_2O$	2.00
KH_2PO_4	170	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
KCl	300	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Sequestrene 330 Fe	25	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Sugars			
Glucose	68400	Mannose	125
Sucrose	125	Rhamnose	125
Fructose	125	Cellobiose	125
Ribose	125	Sorbitol	125
Xylose	125	Mannitol	125
Organic acids (adjusted to pH 5.5 with NH_4OH)			
Sodium pyruvate	5	Malic acid	10
Citric acid	10	Fumaric acid	10
Vitamins			
Inositol	100	Biotin	0.005
Nicotinamide	1	Choline chloride	0.5
Pyridoxine-HCl	1	Riboflavin	0.1
Thiamine-HCl	10	Ascorbic acid	1
D-Calcium pantothenate	0.5	Vitamin A	0.005
Folic acid	0.2	Vitamin D_3	0.005
p-Aminobenzoic acid	0.01	Vitamin B_{12}	0.1
Hormones	Soybean × barley		Soybean × pea or *N. glauca*
2,4-D	1		0.2
Zeatin	0.1		0.5
NAA	--		1
Vitamin-free casamino acid	125 mg l^{-1}		
Coconut water (from mature fruits; heated to 60°C for 30 min and filtered)	10 ml l^{-1}		

يبدأ تمثيل الجدر الخلوية حول البروتوبلاست بمجرد فصل الإنزيمات عنه ويظهر أول الدلائل على تكوين الجدر السيليلوزية بعد نحو ٢-٤ أيام من زراعة البروتوبلاست. بينما تبدأ معظم الانقسامات الخلوية بعد ٧-١٤ يومًا من الزراعة، ويؤدى ذلك إلى تكوين نسيج كالس.

وغنى عن البيان أن تطوير بروتوكول فعال لتجديد النمو لواحد — على الأقل — من كل أبوين مستخدمين فى التهجين الجسمى للبروتوبلاستات يعد أمرًا حتميًا لتحقيق الهدف المرتجى من عملية الدمج (عن Grosser ١٩٩٤)

وعلى الرغم من كثرة وتنوع الأنواع النباتية التى أعطت نمو كالس فى مزارع البروتوبلاست إلا أن معظم الأنواع التى حدث فيها تميز (أى نمت فيها النباتات من مزارع البروتوبلاست) كانت من العائلة الباذنجانية، وتشمل القائمة التى تميزت فيها نباتات من مزارع البروتوبلاست: الفلفل، والبطاطس، والباذنجان، والتبغ، والبيتونيا، وأنواع أخرى قليلة من العائلات المركبة، والصليبية، والنجيلية، والزنبقية، والبقولية وغيرها.

ونقدم فى القائمة التالية بيانًا ببعض الأنواع النباتية (مقسمة حسب العائلات التى تنتمى إليها) التى أمكن تجديد النمو فيها من مزارع البروتوبلاست (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣):

Compositae
Senecio vulgaris
Cruciferae
Arabidopsis thaliana
Brassica napus
Euphorbiaceae
Manihot esculenta
Gramineae
Bromus inermis
Pennisetum americanum
Liliaceae
Asparagus officinalis
Hemerocallis sp.
Leguminosae
Medicago sativa
Trifolium repens

Ranunculaceae

Ranunculus sceleratus

Rutaceae

Citrus sinensis

Solanaceae

Atropa belladonna

Capsicum annuum

Datura metel

D. meteloides

D. innoxia

Hyoscyamus muticus

Nicotiana acuminata

N. alata

N. debneyi

N. glauca

N. langsdorffii

N. longiflora

N. otophora

N. paniculata

N. plumbaginifolia

N. suaveolens

N. sylvestris

N. sylvestris × N. otophora

N. tabacum

N. tabacum × N. otophora

Petunia axillaris

P. hybrida

P. inflata

P. parodii

P. parviflora

P. violacea

Salpiglossis sinuata

Solanum chacoense

S. dulcamara

S. melongena

S. tuberosum

Umbelliferae

Daucus carota

ومن أهم الأنواع الخشبية التى نجح فيها تجديد النمو من مزارع البروتوبلاست ما يلى (عن Bajaj ١٩٨٩):

Citrus spp.
Santalum album
Pyrus communis
Ulmus spp.
Populus tremula
Liriodendendron tulipifera

أهمية مزارع البروتوبلاست

يستفاد من مزارع البروتوبلاست فى النواحى التالية:

١ — تعد مزارع البروتوبلاست أفضل من مزارع الخلايا الكاملة، ويجب استعمالها كبداية فى عمليات الإكثار وعزل السلالات الطفرية.

٢ — دمج بروتوبلاست الأنواع النباتية البعيدة عن بعضها معًا، وهو ما يعد وسيلة فعّالة لإجراء التهجينات البعيدة.

٣ — إدخال تراكيب مجهرية حية أو غير حية فى الخلايا النباتية، ويستفاد من ذلك فى دراسات الهندسة الوراثية.

٤ — إجراء الدراسات الفسيولوجية الخاصة بتمثيل الجدار الخلوى وخصائص الغشاء البلازمى.

٥ — إحداث الإصابة بالفيروسات بإدخالها فى البروتوبلاست مباشرة.

٦ — زراعة كلوروبلاستيدات نباتات عالية الكفاءة فى عملية البناء الضوئى فى بروتوبلاست نباتات منخفضة الكفاءة، ونقل الصفات المرتبطة بالكلوروبلاستيدات (مثل المقاومة لمبيد الحشائش اترازين atrazine فى اللفت) من نوع إلى آخر.

٧ — إدخال صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى فى النباتات (Vasil ١٩٧٦). (أمكن — على سبيل المثال — إدخال صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى بواسطة مزارع البروتوبلاست من النوع *Nicotiana tabacum* إلى *N. Sylvestris*، ومن *Petunia hybrida* إلى *P. Axillaris*؛ عن Sink ١٩٨٤).

٨ – الحصول على تباينات وراثية يمكن الاستفادة منها فى تحسين النباتات، خاصة الأنواع العقيمة منها التى لا تنتج بذورا. (أمكن فى البطاطس – على سبيل المثال – تجديد نمو أكثر من ١٠٠٠ سلالة clone من بروتوبلاست الميزوفيل للصنف رصت بيربانك Russet Burbank أظهرت مدى واسعًا من التباين فى شكل الدرنة، ولون الجلد، والمحصول، وغيرها من الصفات. ومن بين ٨٠٠ سلاله تم اختبارها انتخبت ٢٠ سلالة أظهرت مقاومة للفطر *Phytophthora infestans*. وقد تك مل هذه التباينات الوراثية المتحصل عليها من مزارع البروتوبلاست فى دراسات اجريت على أصناف أخرى من البطاطس، مثل: Fortyfold، و Bintje، و Majestic؛ عن Bajaj ١٩٨٩)

وتعد مزارع البروتوبلاست المتحصل عليها من نباتات أحادية أكثر فائدة من م ارع الكالس الأحادى نظرا لثباتها الوراثى مقارنة بمزارع الكالس، ولأن كل بروتوب ت مُطفر يمكن أن يعطى نباتًا أحاديًا.

كذلك يمكن التعامل مع مزارع البروتوبلاست الأحادية كما لو كانت مزارع ميكروبية، حيث يمكن زراعتها فى أطباق بترى وتعريضها بأعداد كبيرة لمختلف العوامل المطفرة.

ولقد أمكن الحصول على طفرات متعددة فى مزارع البروتوبلاست الأحادى لعديد من الأنواع النباتية سواء أكانت لبروتوبلاستات الميزوفيل (كما فى النفت، والبيتونيا، والتبغ، والبطاطس)، أم لبروتوبلاست الكالس (كما فى الأرز القمح)، أم لبروتوبلاستات وحدات اللقاح الربعبة pollen tetrad protoplasts (كما فى الزمير، والتبغ، ولبيتونيا، والقمح)، أم فى بروتوبلاست حبوب اللقاح (كما فى التبغ، والبيتونيا، والقمح) (عن Bajaj ١٩٩٠)

هذا .. ويمكن حفظ مزارع البروتوبلاست فى النيتروجين السائل على -١٩٦°م، ثم تجديد نموها بصورة عادية، ولا يختلف ذلك عما يحدث بالنسبة لمزارع معلقات الخلايا، إلاّ أن غياب الجدار الخلوى والراوبط البروتوبلازمية plasmodesmata يجعل البروتوبلاست أكثر حساسية للتفجر bursting؛ الأمر الذى يتطلب إعطاء الأمر عناية أكبر – مقارنة بمزارع معلقات الخلايا – فيما يتعلق بكل من الضغط الإسموزى،

والحماية من الحرارة الشديدة الانخفاض بالاختيار المناسب لكل من الـ osmoticum، والـ cryoprotectant

إندماج البروتوبلاست وإنتاج الهجن الجسمية

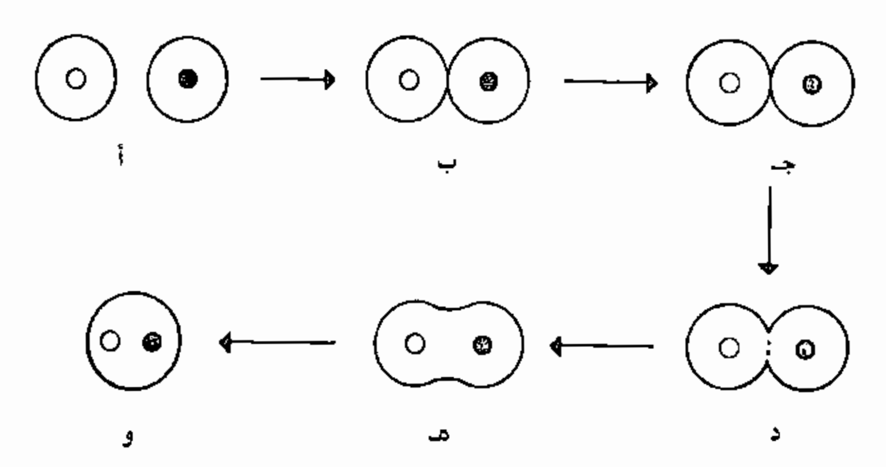
مقدمة

يحدث إندماج للبروتوبلاست Protoplasm Fusion بصورة تلقائية وطبيعيه في مزارع البروتوبلاست المجهزة من خلايا نشطة في الانقسام ويحدث الإندماج باتساع الأغشية البروتوبلازمية المتجاورة والتحام الروابط البلازمية بينها، لتتكون بذلك وحدات بروتوبلازمية جديدة بكل منها من ٢-٤٠ نواة ويمكن تقليل حالات اندماج البروتوبلاست بوضع الخلايا المستخدمة في إعداد مزارع البروتوبلاست في سائل ذى ضغط إسموزى مرتفع، لبلزمتها بغرض قطع الروابط البروتوبلازمية

أما انتاج الهجن الجسميه somatic hybrids فيتطلب اندماج بروتوبلاست الأنواع التى يراد تهجينها. ويستلزم ذلك توفر عامل، أو وسيلة مناسبة لتحقيق الاندماج (fusogen) وقد جربت لذلك معاملات كثيرة أثبت بعضها نجاحا كبيرا في تحفيز اندماج بروتوبلازم الأنواع البعيدة، مثل معاملات نترات الصوديوم، والـ pH المرتفع، والتركيز المرتفع لأيون الكالسيوم، والبوليثيلين جليكول، والمعاملة بتيار كهربائى ذى فولت مرتفع لفترة قصيرة .. إلخ

ويحدث اندماج البروتوبلاست بالطريقة المبينة في شكل (٤-٣)، وينتج عنه إنتاج بروتوبلاست ذى نواتين مختلفتين Binucleate Heterokaryon يعقب الاندماج اختلاط بروتوبلاست الأنواع المندمجة خلال ساعات قليله، وتكون جدارًا خلويًا حول البروتوبلاست المندمج، ثم تدخل الخلية الهجين في انقسامات ينشأ عنها تكون هجين جسمى Somatic Hybrid، وقد تنقسم كل نواة في البروتوبلاست ذى النوايين منفصلة عن الأخرى، دون أن تشترك كروموسوماتها معا في خيوط مغزل واحد، وتنشا عن ذلك حالات من الكيميرا. وقد تستمر الخلايا ذات النواتين المختلفتين في إنتاج خلايا مماثله لعدة أجيال، دون أن تندمج النواتان معا وقد يحدث اندماج للنواتين في الطور البينى

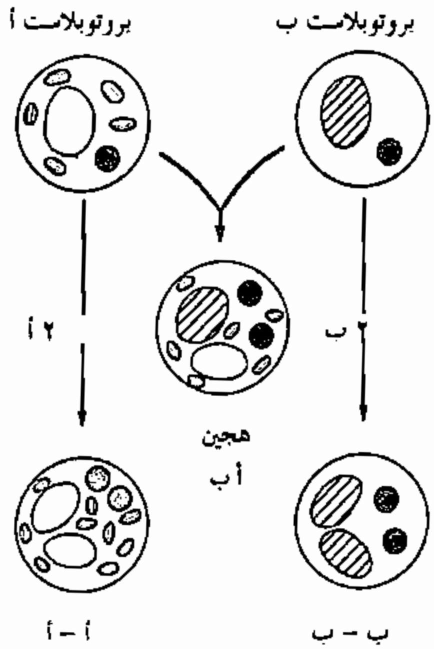
Interphase بين الانقسامات، ولكن هذا الانـدماج لا يترتـب عليـه إنتـاج خليـة هجـين قادرة على الاستمرار فى الانقسـام (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



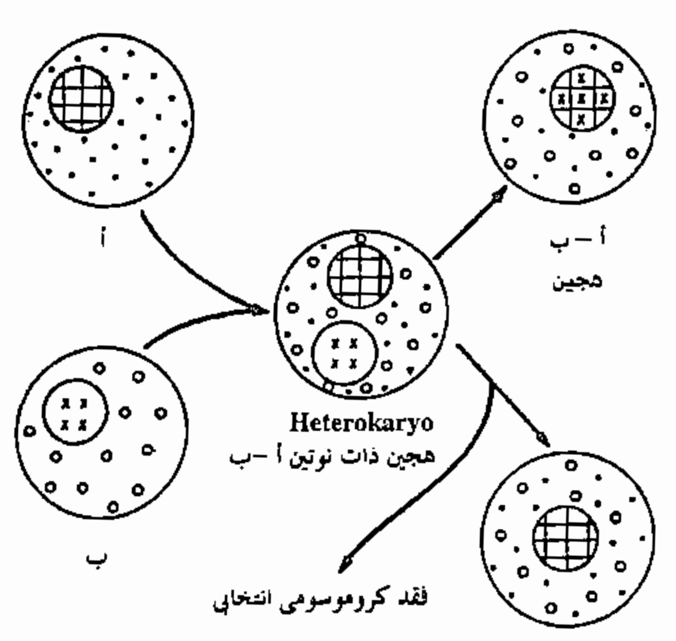
شكل (٤–٣) خطوات عملية اندماج البروتوبلاست لنوعين مختلفين. يبدأ الانـدماج بتقـارب البروتوبلاست كما فى الشكل (ب)، ثم اندماج الأغشية البروتوبلازمية فى منـاطق محـددة (كمـا فى الشكل جـ)، وينتهى بتكوين الخلية ذات النواتين المختلفتين **binucleate heterokaryon**.

ويوضح شكل (٤–٤) بعض الحالات التى يمكن أن تنتج عن إندماج البروتوبلاسـتات الكاملة (عن Dodds ١٩٨٥).

هذا .. ولا يكون اندماج النواتين مفيدا فى إنتاج خلايا هجين hybrids إلا إذا حدث أثناء الانقسام الميتوزى وحتى إذا تكونت الخلايا الهجين فى أثناء الانقسـام الميتـوزى فإن إندماج النواتين لا يكون تامًا فى أغلب الحالات، وكثيرًا ما تـستبعد الكروموسـومات الخاصة بأحد النوعين المندمجين من الخلايا الهجين بعد عدة أشهر مـن الانقسـام كمـا يحدث الشئ ذاته – غالبًا – بالنسبة لعضيّات الخلية، مثل البلاستيدات الخضـراء. وقد تستبعد كروموسومات أحد النوعين، بينما تستبعد بلاستيدات النوع الآخر، ويعطى ذلـك الفرصة لإنتاج خلايا لأحـد النـوعين المهجـنين، وهـى تحتـوى علـى بلاسـتيدات النـوع الآخر، ولنقل عوامـل سـيتوبلازمية (مثـل العقـم الـذكرى) مـن نـوع أو جـنس إلى آخـر وتعرف الهجن التى تحتوى على نواة مـن أحـد الأنـواع وسـيتوبلازم مـن النـوع الآخـر، أو منهما معا باسم سيبرد Cybrids (شكل ٤–٥، Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



شكل (٤–٤): الاحتمالات الممكنة لنواتج الإندماج.



شكل (٤–٥): إنتاج هجين سيتوبلازمي (سيبرد **cybrid**؛ عن **Dodds** ١٩٨٥).

ويتطلب تهجين الخلايا الجسمية somatic cells، ما يلي:

١ — تخليص البروتوبلاست من الجدر الخلوية.

٢ — حث تلامس الأغشية البروتوبلازمية على المستوى الجزيئي، وكذلك حث التحلل والانهيار الجزئي المؤقت لتلك الأغشية؛ حتى تسمح باندماج البروتوبلاستات المستقلة.

٣ — التعرف على الهجن الجسيمة وانتخابها.

٤ — زراعة الهجن البروتوبلازمية في بيئة صناعية

٥ — تجديد النمو النباتي من تلك الهجن (Kao & Michayluk ١٩٨٩).

أهمية التهجين الجسمي

يحقق التهجين الجسمي (دمج البروتوبلاست) المزايا التالية

١ — إمكان إنتاج هجن نوعية وجنسية جديدة بين نباتات يصعب أو يستحيل تهجينها جنسيًّا؛ فهي تتغلب على جميع مشاكل عدم التوافق الجنسي، فمثلاً أمكن دمج بروتوبلاست البطاطس مع بروتوبلاست الطماطم في هجين لا جنسي كذلك تتكون هجن لا تحتوى على العدد الكامل لكروموسومات كلا الأبوين (asymmetric hybrids) عندما يحدث تهجين جزئي وهي هجن تحتوى على أعداد غير عادية من الكروموسومات، أو على تباينات كبيرة منها (جدول (٤-٥)

ويمكن عن طريق هذه التهجينات البعيدة إنتاج أجناس نباتية جديدة تمامًا لم يكن لها وجود من قبل (جدول (٤-٦)

٢ — تفيد الهجن الجسمية — كثيرًا في نقل جينات مرغوب فيها من نوع نباتي لآخر، مثل جينات المقاومة للأمراض والآفات، وتحمل الظروف البيئية القاسية. وصفات الجودة، والمقاومة لمبيدات الحشائش، والعقم الذكرى السيتوبلازمي . والأمثلة الناجحة على ذلك كثيرة جدًّا ومتنوعة (جدولا ٤-٨، و ٤-٩).

٣ — يمكن أن يستفاد من دمج البروتوبلاست كوسيلة بديلة للحصول على نباتات متضاعفة هجينيًا

٤ — يمكن دمج بروتوبلاستات النباتات العقيمة جنسيًا (مثل الأحادية والثلاثية وذات التعدد الكروموسومي غير التام .. إلخ) .. يمكن دمجها معًا لإنتاج نباتات خصبة ثنائية ومتضاعفة

٥ – يكون دمج البروتوبلاست وإنتاج الهجن ممكنًا والنباتات مازالت في طور الحداثة.

٦ – يتيح دمج الخلايا جسميًا فرصة كبيرة لدراسة الجينات السيتوبلازمية ونشاطها، الأمر الذى يمكن توظيفه لخدمة أهداف تربية النبات.

جدول (٤–٥): التباينات فى أعداد الكروموسومات التى ظهرت فى الهجن الجسمية التى نتجت من دمج برتوبلاستات بعض الأنواع النباتية.

الأنواع المندمجة وأعداد كروموسوماتها			عدد الكروموسومات فى الهجين الجسمى
B. campestris (2*n*=18)	+	*B. oleracea* (2*n*=18)	تباينات كثيرة
B. juncea (2*n*=36)	+	*B. napus* (2*n*=38)	تباينات كثيرة
D. stramonium (2*n*=24)	+	*Datura innoxia* (2*n*=24)	٤٦، ٤٨، ٧٢
N. glutinosa (2*n*=24)	+	*N. tabacum* (2*n*=48)	٥٠–٥٨
N. nesophila (2*n*=48)	+	*N. tabacum* (2*n*=48)	٩٦
N. sylvestris (2*n*=24)	+	*N. tabacum* (2*n*=48)	٧٢
L. peruvianum (2*n*=24)	+	*Lycopersicon esculentum* (2*n*=24)	٧٢
P. hrybrida (2*n*=14)	+	*Petunia parodii* (2*n*=48)	٤٤–٤٨
S. chacoense (2*n* = 14)	+	*Solanum tuberosum* (2*n*=24, 48)	٦٠

جدول (٤–٦): هجن جسمية جنسية intergeneric أنتجت بطريقة دمج البروتوبلاست (عن Chawla ٢٠٠٠).

الأنواع النباتية المهجنة جسميًا وأعداد كروموسوماتها			الجنس الجديد
B. Oleracea (2*n* = 18)	+	*Raphanus sativus* (2*n*=18)	*Raphanobrassica*
Moricandia arvensis (2*n* = 27, 28)	+	*B. oleracea* 2*n* = 18)	*Moricandiobrassica*
B. napus (2*n* = 38)	+	*Eruca sativa* (2*n* = 22)	*Erucabrassica*
B. napus (2*n* = 38)	+	*Diplotaxis muralis* (2*n* = 42)	*Diplotaxobrassica*
Lycopersicon esulentum (2*n* = 24)	+	*Nicotiana tabacum* (2*n* = 24)	*Nicotiopersicon*
L. esculentum (2*n* = 24)	+	*Solanum tubersoum* (2*n* = 24)	*Solanopersicon*
Atropa belladana (2*n* = 24)	+	*Datura innoxia* (2*n*=48)	*Daturotrapa*
Echinochloa oryzicola (2*n* = 24)	+	*Oryza sativa* (2*n*=24)	*Oryzachloa*
B. campestris (2*n* = 20)	+	*Arabidopsis thaliana* (2*n* = 10)	*Arabidobrassica*

٧ – يُتيح دمج البروتوبلاست فرصة فريدة للحصول على توافيق خاصة من الأنوية والسيتوبلازم فى التهجينات الجسمية بين مختلف الأنواع ويستدل من عدد من الهجن الجسمية أنه على الرغم من أن نوعين مختلفين من السيتوبلازم قد يختلطا مبدئيًا عند دمج البروتوبلاست، لينتجا ما يعرف بالـ heteroplasmon ، فإنه فى نهاية الأمر يسود سيتوبلازم أحد النوعين، مما يترتب عليه حدوث انعزال سيتوبلازمى؛ الأمر الذى شوهد كثيرًا فى انعزالات الميتوكوندريات والبلاستيدات الخضراء. ويفيد ذلك كله فى إمكان الحصول على جيرمبلازم جديد وفريد لا يمكن الحصول عليه بالطرق الأخرى التقليدية (عن Chawla ٢٠٠٠).

٨ – النقل الجزئى للمادة النووية من نوع نباتى لآخر.

٩ – نقل المادة الوراثية السيتوبلازمية (دنا الميتوكوندريات والبلاستيدات الخضراء)؛ لإنتاج نباتات عقيمة الذكر، أو لنقل صفات سيتوبلازمية أخرى هامة (مثل المقاومة لبعض مبيدات الحشائش) فى cybrids.

١٠ – إنتاج تباينات المزارع somaclonal variations.

١١ – إنتاج نباتات ذات محتوى مرتفع من الألكالويدات وغيرها من نواتج الأيض الثانوية ذات الأهمية

١٢ – إنتاج هجن جسمية للاستعمال كأصول جذرية لأشجار الفاكهة (عن Bajaj ١٩٩٤)

وعلى الرغم من أن الهدف الأصلى الذى كان يسعى إليه الباحثون من وراء دمج بروتوبلاست الأنواع النباتية المختلفة (وهو الحصول على أنواع جديدة تجمع بين صفات الآباء التى دمجت معًا) . على الرغم من أن هذا الهدف الأصلى لم يتحقق، إلا أن تلك الدراسات أثبتت أهمية دمج البروتوبلاست فى توفير تراكيب وراثية جديدة ليس لها نظير فى الطبيعة.

لقد جرت عمليات دمج بروتوبلاست محاصيل مختلفة كلية، كما فى حالتى البطاطس مع الطماطم، والـ *Arabidobrassica*، وعلى الرغم من أنها لم تأت بأى نتيجة

عملية، إلاّ أنها فتحت الطريق أمام احتمالات أخرى كثيرة، مثل دمج البروتوبلاستات الأحادية معًا، والبروتوبلاستات الأحادية مع الثنائية. كذلك أمكن دمج سلالات بطاطس ثنائية التضاعف وخليطة وراثيًا معا، وحُصِل على نباتات رباعية وخليطة وراثيًا، حيث أكثرت بسهولة خضريًّا مع المحافظة على تركيبها الوراثي الخليط. ولقد فتحت الهجن السيتوبلازيمة (أو cybrids) مجالا واسعًا لنقل المادة الوراثية السيتوبلازمية من نوع لآخر مع احتفاظ الأخير بهيئته الكروموسومية النووية. ومن بين الصفات الهامة التي يتحكم فيها جينات سيتوبلازمية — توجد في البلاستيدات أو في الميتوكوندريا — تلك الخاصة بالعقم الذكري السيتوبلازمي، وبجهاز البناء الضوئي، ونقص الكلوروفيل، وإنزيمات تمثيل الكربون، ومقاومة الاستربتومايسين (عن Bajaj ١٩٨٩).

يتلخص الأمر بالنسبة لاستخدام مزارع البروتوبلاست في إنتاج الهجن البعيدة في أن غالبية المحاولات في هذا الاتجاه كانت على الأجناس التي يسهل الحصول فيها على نبتات من مزارع البروتوبلاست، وهي: *Nicotiana*، و *Petunia*، و *Daucus*، و *Solanum*، و *Datura*. ويلزم تطوير تقنية إنتاج النباتات من مزارع البروتوبلاست في أجناس أخرى مهمة لكي يمكن أن تشملها محاولات الهجن البعيدة.

وقد أمكن — عن طريق دمج بروتوبلاست الأنواع البعيدة — معًا — في مزارع البروتوبلاست — إنتاج أربعة أنواع من الهجن هي:

١ — هجن تحتوى على العدد الكامل لكروموسومات الأبوين (أي متعددة المجموعات الكروموسومية شبيهة بالثنائية Amphidiploids مثل الهجن (*Datura innoxia + D. stramonium*)، و (*D. innoxia + D. discolor*).

٢ — هجن خليطة وعقيمة أنتجت بإضافة هيئات كروموسومية من أنواع برية إلى النوع المزروع، وتكثر خضريًّا كما في جنس البطاطس *Solanum*.

٣ — هجن تحتوى على جزء فقط من الهيئة الكروموسومية لأنواع أخرى، مثل غالبية الهجن التي أنتجت حتى الآن.

٤ — هجن تحتوى على نواة أحد الأنواع، وسيتوبلازم النوع الآخر، أو كلا النوعين المهجنين سيبرد Cybrids، عن Schieder ١٩٨٢).

وسائل تحفيز دمج البروتوبلاست

يمكن في واقع الأمر دمج بروتوبلاست أي نوعين نباتيين، بل أن بروتوبلاست أنواع نباتية يمكن دمجها مع بروتوبلاستات الأنواع الحيوانية

ومن بين أهم الطرق التي اتبعت لأجل تحفيز اندماج البروتوبلاست، ما يلي:

١ - الاندماج التلقائي

من المعروف أن اندماج البروتوبلاستات يحدث تلقائيًا أثناء التحلل الانزيمي للجدر الخلوية. وقد أرجع ذلك الى تمدد الروابط البروتوبلازمية بين البروتوبلاستات الخاصة بالخلايا المجاورة. وقد لوحظ - على سبيل المثال - أن ٢٥٪ من البروتوبلاستات المعزولة من خلايا فول الصويا المزروعة كانت عديدة الأنوية، وفي النوع *Vicia hajastana* كان متوسط عدد الأنوية بكل بروتوبلاست ٢.٤٥ بينما تراوح المدى بين نواة واحدة، و ٤٥ نواة. كذلك وجد في إندوسبرم الذرة أن ٥٠٪ من البروتوبلاستات المعزولة إنزيميًا كانت متعددة الأنوية ويحتوي كل منها على نواتين إلى ٢٨ نواة.

٢ - الطريقة الميكانيكية

عندما تمر البروتوبلاست من خلال ماصة دقيقة ذات فتحة ضيقة جدًا يحدث اندماج بعضها، ولكن نسبة الاندماج تكون منخفضة. ولذا فإن تلك الطريقة لم تعد متبعة.

٣ - رفع الـ pH في وجود الكالسيوم

يؤدي توفير أيون الكالسيوم عند pH مرتفع (١٠.٥) الى تحفيز دمج البروتوبلاست. وفي هذه الطريقة تحضن البروتوبلاست التي يُراد دمجها معًا في محلول يحتوي على كلوريد الكالسيوم $CaCl_2.2H_2O$ (٠.٠٥ مولار)، وجليسين الصوديوم Na glycine (٠.٠٥ مولار)، ومانيتول (٠.٤ مولار) عند pH ١٠.٥. يحفظ قرص البروتوبلاست لتكون بعد إجراء الطرد المركزي على ٥٠ مثل الجاذبية لمدة ٣ دقائق. يحفظ في حمام مائي على ٣٧°م لمدة ٤٠-٥٠ دقيقة حيث تحدث الاندماجات.

٤ - المعاملة بنترات الصوديوم

توضع البروتوبلاست في مخلوط يتكون من نترات صوديوم (بنسبة ٥.٥٪) وسكروز

(بنسبة ١٠٪) على ٣٥°م لمدة ٥ دقائق. يؤدى الطرد المركزى بعد ذلك (على ٢٠٠ مثل الجاذبية) لمدة ٥ دقائق إلى ترسب البروتوبلاستات على صورة قرص يحفظ على ٣٠°م لمدة ٣٠ دقيقة فى حمام مائى، حيث تحدث الاندماجات.

وقد تبين أن البروتوبلاستات المعزولة من القمم النامية لجذور الشوفان وبعض الحبوب النجيلية الأخرى فى ٠,٥٦ مولار سكروز مع ١٠٪ سيليوليز cellulase، و ٥٪ macerozyme .. كان لها القدرة على الاندماج فى محلول من نترات الصوديوم بتركيز ٠,٢٥ مولار. وقد تكرر ذلك فى حالات أخرى، مثل التهجين الجسمى للنوع *Nicotiana glauca* مع *N. langsdrffii*.

٥ — استخدام البروتينات:

يؤدى البروتين جيلاتين gelatin والنواتج الأولية لتحلله عندما يكون بتركيز ٢-٥٪ إلى إحداث تجمع يتسبب فى حدوث اندماجات بين البروتوبلاستات (عن Kao & Michayluk ١٩٨٩، و Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

٦ — اندماج البروتوبلاستات بالأحماض الدهنية والإسترات.

٧ — اندماج البروتوبلاستات بالصدمة الأُسموزية:

أمكن تحقيق نجاح محدود فى دمج بروتوبلاستات الأنواع المختلفة بتعريضها لصدمة إسموزية معتدلة، وكان معدل الاندماج النوعى أقل من ١٪، وبمعدل حوالى ٠,١٪.

٨ — اندماج البروتوبلاستات بالدكستران وكبريتات الدكستران dextran sulfate:

أدت الدكسترانات ذات الوزن الجزيئى المرتفع (بتركيز ١٥٪) فى وجود الأملاح غير العضوية إلى حث تكتل البروتوبلاستات وإلى اندماجها بنسبة ١٠٪.

٩ — اندماج البروتوبلاستات بمساعدة الـ polyviny alchol (اختصارًا: PVA):

يمكن حث التصاق البروتوبلاستات واندماجها بالـ PVA، وتتكون أكثر المحاليل فاعلية فى دمج الخلايا من: ١٥٪ (وزن/وزن) PVA، و ٠٠٥ مولار كلوريد كالسيوم، و ٠,٣ مولار مانيتول. هذا .. وليس للـ PVA أية تأثيرات ضارة على حيوية البروتوبلاستات.

١٠ — اندماج البروتوبلاستات بمساعدة البوليثيلين جليكول polyethylene glycol (اختصارا PEG):

تعتمد أكثر الطرق نجاحًا فى دمج البروتوبلاستات الهجين على البولىاثيلين جليكول PEG الذى يحفز التصاق البروتوبلاستات واندماجها يتميز الـ PEG بفاعليته، وقلة تكلفته، وعدم سميته للبروتوبلاست إذا ما زادت فترة التعرض له وتاريخيًا استعمل بدايه الـ PEG ذات الوزن الجزيئى المرتفع (٦٠٠٠–٨٠٠٠)، ولكن تحول الاتجاه بعد ذلك إلى استعمال الـ PEG ذات الوزن الجزيئى المنخفض (١٥٠٠)، والذى وجد أنه أكثر كفاءة وقد تبين أن فعل الـ PEG ليس متخصصًا على أنواع نباتية بعينها، حيث كان فعالاً فى دمج بروتوبلاستات عديد من الأنواع النباتية التى تنتمى إلى أجناس وعائلات مختلفة.

ويفضل لأجل الحصول على هجن جسمية حرة وطليقة — عند المعاملة بالبوليثيلين جليكول — دمج البروتوبلاست عند السطح البينى interface لمحلولين، فقد أدى دمج البروتوبلاست عند السطح البينى لكل من الـ PEG-sucrose (البواليثيلين جليكول مع السكروز)، ومحلول الجلوكوز، مع pH عالٍ وصدمة أسموزية . أدى ذلك إلى إنتاج ٣٠٪ من الهجن الجسمية (الـ heterokaryocytes) الحرة والطليقة والعالية الحيوية

وتتلخص طريقة الـ PEG لدمج البروتوبلاست فيما يلى:

أ — يوضع حوالى ١٥٠ ميكروليتر من ٤–٥٪ (حجم/حجم) من معلق البروتوبلاست على غطاء شريحة زجاجية فى طبق بترى وتترك حتى ترسب البروتوبلاستات فى طبقة رقيقة.

ب —يضاف ببطء حوالى ٣٠٠–٤٥٠ مل من محلول الـ PEG (جدول ٤–٧) إلى تحضير البروتوبلاست

جـ – يحضن البروتوبلاست فى محلول الـ PEG على حرارة الغرفة لمدة ١٠–٢٠ دقيقة

د — يتم التتخلص من الـ PEG ببطء باستعمال بيئة مزارع البروتوبلاست

جدول (٤–٧): محاليل تستخدم فى دمج البروتوبلاستات.

المركب	المحول	
	PEG	pH مرتفع + أيون الكالسيوم
الجلوكوز (جم)	—	٥,٤
PEG ١٥٤٠ (جم)	٥٠	—
كلوريد كالسيوم به جزيئين من الماء (مجم)	١٥٠	٧٣٥
فوسفات أحادى البوتاسيوم (مجم)	١٠	—
الجليسين (مجم)	—	٧٣٥
الماء (مل)	١٠٠	١٠٠
الـ pH	٥,٥–٦,٥ (أيدروكسيد البوتاسيوم)	١٠,٥ (أيدوكسيد الصوديوم)

وقد حُصل علـى نسـبة انـدماج عاليـة للبروتوبلاسـتات – بلغـت ٥٠٪ – حينمـا تم التخلص من الـ PEG فى pH مرتفع (١٠,٥) مع تركيز عالٍ مـن الكالسـيوم، ثـم غسـيل البروتوبلاسـتات المعاملة ببيئة زراعة البروتوبلاست.

كما وجد أن إضافة الـ dimethylsulfoxide إلى الــ PEG يمكـن أن يزيـد مـن معـدل اندماج البروتوبلاسـت.

ويعيب دمج البروتوبلاستات على غطاء شريحة زجاجية أنها تميل إلى الالتصاق بقوة بالغطاء لعدة أيام تختفى أثناءها الاختلافات المورفولوجية بين الخلايـا الأبويـة والهجـن الجسمية؛ ممـا يجعـل مـن الصـعب عـزل الهجـن بالوسـائل الميكانيكيـة (عـن Kao & Michayluk ١٩٨٩).

وتؤثر كثير من العوامل فى مدى كفـاءة الــ PEG علـى حـث التصـاق البروتوبلاستات واندماجها، وفى حيوية البروتوبلاستات خليطة النوايا الناتجة عن الاندماج (الـ heterokaryocytes)، كما يلى:

أ – لا يحدث الالتصـاق القـوى للبروتوبلاسـتات، وانـدماجها بنسـبة عاليـة إلاّ فـى التركيزات العالية من الـ PEG.

ب – تزداد فاعلية الـ PEG فى التصاق البروتوبلاستات واندماجها بتزويد محلول الـ PEG بأيونات الكالسيوم. بينما تثبط تلك الفاعلية فى وجود تركيزات عالية من البوتاسيوم أو الصوديوم فى الـ pH المرتفع. هذا إلاّ أن توفر الكالسيوم بالقدر العالى الكافى يمكن أن يحدث معه الالتصق والاندماج حتى فى وجود تركيزات عالية من الصوديوم فى pH عال.

جـ - للضغط الإسموزى لمختلف المحاليل تأثيرات كبيرة على اندماج البروتوبلاستات وحيويتها

د – تعد البروتوبلاستات المتحصل عليها من الأوراق الصغيرة، أو من المزارع السريعة النمو هى الأفضل لأجل الاندماج، بينما لا تعد البروتوبلاستات المتحصل عليها من خلايا الميزوفيل الكبيرة السن، أو خلايا المزارع المسنة مناسبة للاندماج، هذا مع العلم بأن الخلايا المسنة تحتوى على جدار خلوى ثانوى لا يهضم إنزيميًا. كذلك فإن التجديد السريع للجدر الخلوية قبل تعريض البروتوبلاستات لعامل الدمج fusogenic agent يمكن أن يقلل -- كذلك – من عملية الاندماج

هـ - تعرف تأثيرات ضارة للـ PEG على البروتوبلاستات، ولكن ربما ترجع تلك الأضرار – حقيقة – إلى الشوائب التى قد توجد مع الـ PEG، وليس إلى الـ PEG ذاته وقد وجد أن الـ PEG المزال منه الأملاح (desalted) أقل ضررًا بكثير على البروتوبلاستات عن الدرجة التجارية الصيدلانية من الـ PEG

و – لكل من تركيز الإنزيمات المستعملة وأنواعها تأثيرات جمة على اندماج البروتوبلاستات وحيوية الـ heterokaryocytes المنتجة

ز – تلعب كثافة البروتوبلاستات التى يتم التعامل معها دورًا هامًّا فى اندماجها، فالكثافة يجب تنظيمها بحيث تحدث معظم الاندماجات بين بروتوبلاستين اثنين، مع خفض الاندماجات المتعددة للبروتوبلاستات إلى أدنى مستوى ممكن. ومن بين تركيزات معلقات البروتوبلاستات التى استخدمت بنجاح: ٥–١٠٪ (حجم/حجم) عند اتباع طريقة السطح البينى للـ PEG-sucrose والجلوكوز، و ٤–٥٪ (حجم/حجم) عند ترسيب

البروتوبلاستات على سطح صلب بطرق الـ PEG، و ٢-٨ × ١٠[٤]/مل عند اتباع طريقة الدمج الكهربائى electrofusion

ح – توجد تباينات كثيرة بين البروتوبلاستات المتحصل عليها من مختلف الأنواع النباتية في مدى تحملها للمعاملة بالإنزيمات ومستحثات الدمج.

١١ – الاندماج الكهربائى.

أصبح دمج البروتوبلاستات يجرى – حاليًا – بصورة روتينية وبكفاءة عالية بالمعاملة بالتيار الكهربائى. تبدأ عملية الدمج الكهربائى بإعادة تعليق البروتوبلاستات فى بيئة ذات درجة توصيل كهربائى منخفضة، ووضعها فى تجويف يحيط به قطبين كهربائيين، ثم إمرار تيار متردد (AC). يؤدى ذلك إلى تحرك البروتوبلاستات في الحقل الكهربائى بخاصية الـ dielectrophoresis، والتصاقها بعضها ببعض كما لو كانت حبات في مسبحة. يلى ذلك إعطاء نبضة قصيرة من تيار مستمر (DC) بقوة ١٠-١٢ كيلو فولت/سم، بهدف حث البروتوبلاستات المتجاورة على الاندماج معًا.

وباتباع هذه الطريقة أمكن إحداث اندماجات بنسبة ٨٠-١٠٠٪ فى عديد من الأنواع، بينما لم تتعد النسبة ١٠٪ إلاّ نادرًا عند اتباع الطرق الكيميائية وفى كثير من الحالات أظهرت البروتوبلاستات المندمجة كهربائيًا تجديدًا أفضل للنمو بعد زراعتها.

وإلى جانب إعطاء هذه الطريقة لنسبة عالية من الاندماجات، فإنها غير سامة، وتعطى نتائج يمكن تكرارها.

وتتوفر – حاليًا – أجهزة دمج البروتوبلاست على نطاق تجارى (عن Kao & Michayluk ١٩٨٩، و Bajaj ١٩٩٤، و Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

هذا .. وتندمج البروتوبلاستات الصغيرة الحجم بمعدلات أقل من معدلات اندماج البروتوبلاستات الكبيرة الحجم، كما تؤثر كثافة البروتوبلاست فى معدل اندماجها وعلى قابليتها للزراعة فى البيئات، حيث تخفض الكثافة العالية من معدل الاندماج (عن Grosser ١٩٩٤).

انتخاب الاندماجات البروتوبلاستية المرغوب فيها

تمثل البروتوبلاستات المندمجة من الهجن الجسمية المرغوب فيها – عادة – أقل من ١٠٪ من الاندماجات الكلية، ويتعين بذل كثير من الوقت والجهد لأجل انتخاب الهجن الخلوية المرغوب فيها.

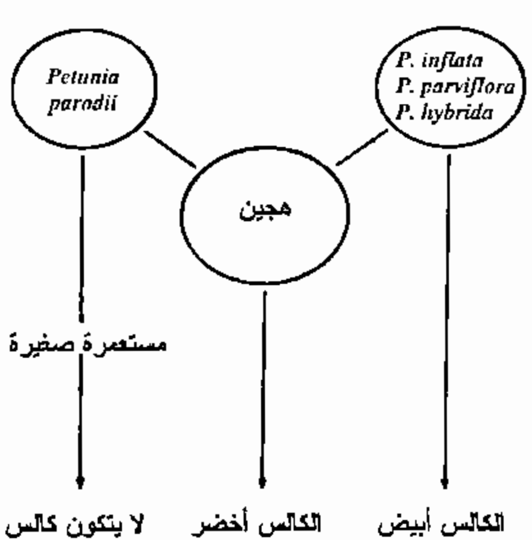
ومن بين الطرق الشائعة الاستعمال لتحقيق ذلك الهدف، ما يلي:

١ – التعرف على الهجن الخلوية مورفولوجيًا بعد اندماج خلايا تختلف مظهريًا أو تختلف في ألوان الصبغات التي تُعامل بها

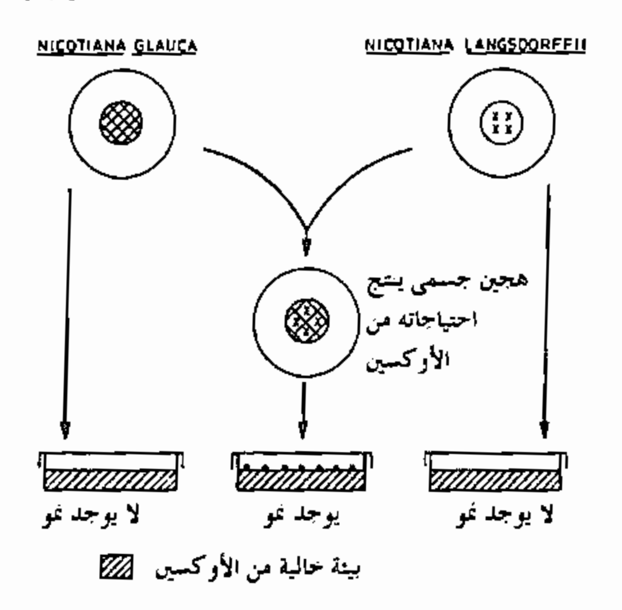
٢ – ظهور قوة الهجين بالهجن الخلوية في مرحلة النمو الكالوسي

٣ – الاختلاف المورفولوجي شكل (٤–٦) أو الفسيولوجي (شكل ٤–٧) بين أنسجة نموات الأبوين والهجين بينهما في المراحل التالية للمزارع (عن Waara & Glimelius ١٩٩٥).

٤ – الطرد المركزي مع فصل الهجن على أساس الكثافة النوعية (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



شكل (٤–٦): طريقة انتخاب الخلايا الهجين بين النوع ***Petunia parodii*** وأي من الأنواع ***P. inflata***، أو ***P. parviflora***، أو ***P. hybrida*** باستعمال مزارع البروتوبلاست.



شكل (٤-٧): الانتخاب على أساس قدرة الهجين على إنتاج الأوكسين الذى يلزم لنموه، بينما يفتقر الأبوين لتلك الخاصية.

زراعة الهجن البروتوبلاستية المنتجة وتجديد نموها

يلى دمج البروتوبلاستات واختيار المرغوب منها زراعتها فى بيئة جديدة للسماح بتمثيل الجدر الخلوية وانقسام الخلايا المتكونة.

تقوم البروتوبلاستات المزورعة بتمثيل الجدر الخلوية فى خلال ١٠-٢٠ دقيقة من زراعتها، وتستكمل العملية فى نحو ٧٢ ساعة. وتمر الخلايا الجديدة المتكونة (الـ plastocytes) بأول انقسام لها بعد نحو ٢-٥ أيام وبعد نحو ٣-٤ أسابيع من التحضين تظهر مستعمرات بحجم رأس الدبوس تستمر فى الزيادة فى الحجم لتكون كالس. وهو الذى يتجدد منه النمو النباتى بعد نقله إلى بيئة جديدة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

أمثلة متنوعة للهجن البعيدة الجسمية التى أمكن الحصول عليها بدمج البروتوبلاست

كان الهجين *Nicotiana tabacum* x *N. langsdorfii* هو أول هجين جسمى ينتج.

وذلك في عام ١٩٧٢، وأعقب ذلك إنتاج عشرات من الهجن الجسمية الأخرى (عن Bajaj ١٩٨٩).

ونقدم – فيما يلي – عددًا من القوائم لحالات تم فيها دمج البروتوبلاستات لأجل الحصول على هجن جسمية.

- قائمة Bhojwani & Razdan (١٩٨٣):

أولا: أنواع متوافقة جنسيًا

عدد الكروموسومات في الهجن	
36, 34-54	*Daucus carota* (2*n*=18) + *D. capillifolius* (2*n*=18)
42	*Nicotiana glauca* (2*n*=24) + *N. langsdorffi* (2*n*=18)
56-64	
42, 28-183	
66, 71	*N. tabacum* (2*n*=48) + *N. alata* (2*n*=18)
72	*N. tabacum* (2*n*=48) + *N. glauca* (2*n*=24)
56-64	*N. tabacum* (2*n*=48) + *N. glutinosa* (2*n*=24)
66,68,72,120, 104-115	*N. tabacum* (2*n*=48) + *N. knightiana* (2*n*=24)
48	*N. tabacum* (2*n*=24) + *N. otophora* (2*n*=24)
48, 46-96	*N. tabacum* (2*n*=24) + *N. sylvestris* (2*n*=24)
24, 48, 48-80	
48	
24-28	*Petunia parodii* (2*n*=14) + *P. hybrida* (2*n*=14)
28, ?	*P. parodii* (2n=14) + *P. inflata* (2*n*=14)
?	*Solanum tuberosum* (2n=24-84) + *S. chacoense* (2*n*=24)

ثانيا: أنواع غير متوافقة جنسيًا:

عدد الكروموسومات في الهجن	
72	*Datura innoxia* (2*n* = 24) + *D. candida* (2*n* = 24)
48, 72	*D. innoxia* (2*n* = 24) + *D. discolor* (2*n* = 24)
48, 72, 96, ?	*D. innoxia* (2*n*=24) + *D. sanguinea* (2*n*=24)
46, 48, 72	*D. innoxia* (2*n*=24) + *D. stramonium* (2*n*=24)
?	*Nicotiana sylvestris* + *N. knightiana*
72	*N. tabacum* (2*n*=24) + *N. nesophila* (2*n*=48)
96	*N. tabacum* (2*n*=48) + *N. nesophila* (2*n*=48)
72	*N. tabacum* (2*n*=24) + *N. stocktonii* (2*n*=48)
31, 36, 40	*Petunia parodii (2n=14) + P. parviflora (2n=18)*

ثالثا هجن جنسية (بين أجناس مختلفة) intergeneric

55,60	*Arabidopsis thaliana* (2n=40) + *Brassica campestris* (2n=20)
?	*Nicotiana tabacum* + *Lycopersicon* sp.
?	*Daucus carota* + *Aegopodium podagaria*
50-70	*Solanum tuberosum* (2n=24) + *Lycopersicon esculentum* (2n=24)
84-175	*Datura innoxia* (2n=48) + *Atropa belladonna* (2n=24)
19	*Daucus carota* (2n=18) + *Petroselinum hortense* (2n=22)

● قائمة Hanson وآخرون (١٩٨٩)

L. esculentum cv. San Marzano + *Solanum rickii* LA 1974

L. esculentum cv. UC82B + *L. pennellii* LA 716

● قائمة Bajaj (١٩٩٤)

المجموعة النباتية	حالات الدمج
البطاطس والطماطم	
	Solanum tuberosum + *Lycopersicon seculentum*
	S. tuberosum + *S. brevidens*
	S. tuberosum + *S. chacoense*
	S. tuberosum + *S. nigrum*
	S. tuberosum + *S. phureja*
	S. tuberosum + *S. torvum*
	S. tuberosum + *Nicotiana tabacum*
	S. tuberosum + *N. plumbaginifolia*
	Solanum cybrids
	Lycopersicon esculentum + *S. nigrum*
	L. esculentum + *S. lycopersicoides*
	L. esculentum + *S. rickii*
	L. esculentum + *S. acaule*
	L. esculentum + *S. peruvianum*
	L. esculentum + *S. muricatum*
	L. esculentum + *S. tuberosum*
	L. esculentum + *S. peruvianum*
	L. esculentum + *L. pennellii*

البقوليات والبذور الزيتية

Brassica napus + B. campestris
B. napus + B. oleracea
B. napus + B. napus
B. napus microfusion
B. napus resynthesis
B. oleracea + B. campestris
Moricandia arvensis + B. oleracea
B. oleracea + B. napus
B. napus + B. nigra
B. hirta + B. napus
Eruca sativa + B. juncea
Arabodopsis thaliana + B. campestris
A. thaliana + B. napus
Eruca sativa + B. napus
Sinapis turgida + B. species
S. alba + B. napus
Barbarea vulgaris + B. napus
Thlaspi perfoliatum + B. napus
Diplotaxis harra + B. napus
Brassica cybrids
Arachis hypogaea + A. villosa
Medicago sativa + M. falconata
M. sativa + M. arborea
M. sativa + Lotus corniculatus
Lotus corniculatus + Glycine max
Pisum sativum + Oryza sativa
P. sativum + Triticum aestivum
Trifolium rubens + T. pratense
T. pratense + T. hybridum
Vicia faba + Petunia hybrida

الحبوب الصغيرة والنجيليات

Oryza sativa + Pisum sativum
O. sativa + Daucus carota
O. sativa + Echinocloa oryzicola

O. sativa + *Glycine max*
O. sativa + wild species
O. sativa intraspecific somatic hybrids/cybrids
O. sativa male sterile hybrids
Zea mays + *Triticum* sect. *tritirigia*
Triticum aestivum + *Pisum sativum*
Triticum monococcum + *Pennisetum americanum*
Pennisetum americanum + *Panicum maximum*
Saccharum officinarum + *Pennisetum americanum*
Festuca arundinacea + *Lolium multiflorum*
Oryza sativa + *Porteresia coarctata*

الخضر

Daucus carota + *Petroselinum hortense*
D. carota + *D. capillifolious*
D. carota + *Oryza sativa*
D. carota + *Nicotiana tabacum*
Lactuca sativa + *L. serriola*
L. sativa + *L. virosa*
Solanum melongena + *S. sisymbriifolium*
S. melongena + *S. torvum*
S. melongena + *S. khasianum*
S. melongena + *Nicatiana tabacum*
S. melongena + *S. aethiopicum*
S. melongenu + *S. nigrum*
Cabbage + Chinese cabbage
Japanese radish + Cauliflower
Raphanus sativus + *B. oleracea*

الأشجار

Citrus sinensis + *Severinia disticha*
C. sinensis + *C. unshiu*
C. sinensis + *C. paradisi*
C. sinensis + *C. limon*
C. reticulata + *C. aurantium*
C. reticulata + *Citropis gilletiana*
C. unshiu + *C. jambhiri*

C. sudachi + C. aurantifolia
C. aurantifolia + Feroniella lucida
C. aurantifolia + Swinglea glutinosa
Citrus + Microcitrus
Carica candamarcensis + C. papaya
Datura tree species + *Datura* herbaceous
Populus + Hibiscus sabariffa
Populus Korcana + Populus nigra
Pyrus communis(Prunus avium × pseudocerasvs)

النباتات الطبية والعطرية ونباتات الزينة

Atropa belladonna + Nicotiana plumbaginifolia
A. belladonna + Scopolia carniolica
Datura innoxia + D. stramonium
D. innoxia + A. belladonna
Datura mutants
Dianthus species
Duboisia hopwoodi + N. tabacum
D. leichhardtii + N. tabacum
Hyoscyamus muticus + N. tabacum
N. tabacum + N. knightiana
N. tabacum + N. sylvestris
N. tabacum + N. glutinosa
N. tabacum + N. debneyi
N. tabacum + N. repanda
N. glauca + N. langsdorfii
N. glauca + N. tabacum
N. rustica + N. tabacum
N. sylvestris + N. tabacum
N. sylvestris + N. rustica
N. tabacum + Petunia hybrida
N. tabacum + Daucus carota
N. tabacum + Glycine max
N. glauca + G. max
N. tabacum + Solanum melongena
N. tabacum + Hordeum vulgare
N. tabacum + Salpiglossis sinuata

Tobacco cybrids
Petunia hybrida + *P. parodii*
P. hybrida + *N. tabacum*
P. hybrida + *Vicia faba*
P. inflata + *P. parodii*
Rauwolfia serpentina + *Vinca minor*
R. serpentina + *Rhazya stricta*
Solanum khasianum + *S. melongena*

النباتات الدنيئة

Algae
Zygnema + *Spriogyra*
Ulva pertusa + *U. conglobata*
Porphyra yezoensis + *P. pseudolinearis*
Enteromorpha + *Ulvaria*
Gracilaria chilensis + *G. tikvahiae*
Ulva + *Enteromorpha*
Porphyra yezoensis + *P. haitansis*
Bryophytes
Physcomitrella patens mutants
Funaria hygrometria wild-type mutants
Liverworts
Ferns
Pteridium aquilinum
Streptomycin-resistant + streptomycin-sensitive

ومن الأمثلة الأخرى ما يلي:

○ أمكن الحصول على هجن جسمية رباعية التضاعف بدمج بروتوبلاستات الطماطم مع النوع *Solanum lycopersicoides* بطريقة الدمج الكهربائي. وقد أعطت النباتات الرباعية (٢س = ٤ن = ٤٨) حبوب لقاح خصبة، أو أنتجت — بالتلقيح الذاتي — ثمارا احتوت على بذور كاملة الحيوية. كما تحملت غالبية النباتات الهجين المختبرة معاملة تعريض للبرودة تراوحت بين -٣ ١ إلى ٣ ْم (Hossain وآخرون ١٩٩٤)

○ تعد السلالات العقيمة الذكر ذات أهمية بالغة فى إنتاج هجن الأرز، وقد جرت محاولات لتحقيق ذلك الهدف عن طريق دمج البروتوبلاست

● كذلك أمكن دمج بروتوبلاستات الجنسين *Microcitrus*، و *Citrus* معًا، علمًا بأن الجنس الأول قد يعطى صفة العقم الذكرى التى قد تقود إلى إنتاج ثمار بكرية العقد (عن Bajaj ١٩٩٤).

● أجرى Tang & Punja (١٩٨٩) دراسات مزارع البروتوبلاست اللازمة لزراعة، ودمج بروتوبلاست الخيار مع بروتوبلاست السلالة P.I. 292190 من النوع البرى *Cucumis metuliferus* المقاومة لكل من نيماتودا تعقد الجذور، وفيرس موزايك الزوكينى الأصفر، وفيرس موزايك البطيخ رقم (١).

● كما أمكن نقل صفة المقاومة لمبيد الحشائش أترازين atrazine من محصول لفت الزيت إلى القنبيط، عن طريق دمج بروتوبلاست المحصولين معًا، ثم تعريض البروتوبلاست المندمج للأترازين وقد أنتجت الخلايا التى أمكنها البقاء نباتات قنبيط مقاومة للمبيد (HortScience — المجلد ٢٣ — العدد ٣).

● أُجرى الأمر ذاته بالنسبة للطماطم، حيث هجنت مع النوع *Solanum nigrum* المقاوم للأترازين، مع التخلص من نواة النوع الأخير وسيتوبلازم الطماطم، وأمكن بذلك إنتاج سيبرد Cybrid يحتوى على الطماطم وسيتوبلازم *S. nigrum* الذى توجد به المقاومة للأترازين (عن Fobes ١٩٨٧).

● ومن بين الأنواع الجديدة من الصليبيات التى أمكن الحصول عليها بدمج بروتوبلاستات أجناس مختلفة، ما يلى:

- *Raphanobrassica*
- *Thlaspobrassica*
- *Brassica naponigra*
- *Arabidobrassica*
- *Erucobrassica*
- *Barbareobrassica*
- *Brassica napooleracea*

● كذلك أمكن دمج بروتوبلاست الباذنجان *Solanum melongena* مع بروتوبلاستات عديد من الأنواع الأخرى من الجنس *Solanum*، مثل النوع *S. sisymbriifolium* لنقل صفتى المقاومة لكل من نيماتودا تعقد الجذور والعنكبوت الأحمر، والنوع *S. torvum* لنقل صفة المقاومة لذبول فيرتسيلليم، والنوع *S. nigrum* لنقل صفة المقاومة للأترازين.

● وفى البطاطس *S. tuberosum* أمكن الحصول على cybrids عديدة استخدمت فيها الأنواع المعطية (معطية للسيتوبلازم فقط) التالية. *S. etuberosum*، و *S. brevidens*، و *S. berthaultii*، علمًا بأن صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى قد أصبحت هدفًا هامًا فى برامج التربية لأجل إنتاج هجن بذرية التكاثر (عن Bajaj ١٩٩٤)

● أمكن باستخدام تقنية دمج البروتوبلاست (طريقة الدمج الكهربى electrofusion) إنتاج هجن جسمية جمعت بين الطماطم *Lycopersicon esculentum*، والبيبينو pepino (*Solanum muricatum*). وقد تم بهذه الطريقة نقل عديد من صفات البينيو إلى الطماطم، ولكن النباتات المتحصل عليها كانت على درجة عالية من العقم، ولم تنتج أية ثمار بالتلقيح الذاتى، ولكن بتلقيحها رجعيًا إلى الطماطم أمكن إنتاج ثمارًا احتوت على بعض البذور، ولكنها كانت فاقدة القدرة على الإنبات (عن Sakamoto & Taguchi ١٩٩٤)

● كذلك أمكن باستخدام تقنية دمج البروتوبلاست الجمع — فى هجن جسمية — بين بروتوبلاست الباذنجان *Solanum melongena* وكلا من. *S. khasianum*، و *S. torvum*، و *S. nigrum*، و *S. aethiopicum*، و *Nicotiana tabacum*، و *Lycopersicon pennellii* (عن Sihachakr وآخرين ١٩٩٤)

● أمكن كذلك — إعادة تركيب النوع *Brassica napus* باستخدام تقنية دمج بروتوبلاست *B. rapa* مع *B. oleracea* (عن *Jourdan* ١٩٩٤).

● أمكن إنتاج هجين جسمى بين صنفين غير متوافقين جنسيًا من البطاطا، هما: *Koganesengan*، و *Bitambi*، وذلك لأول مرة، حيث كان الهجين وسطًا بين الأبوين فى صفات لون وشكل الورقة، كما احتوت على العدد الكامل لكروموسومات الأبوين [٢ن=١٢س (٢ن + ٢ن) = ١٨٠] (Wang وآخرون ١٩٩٧)

الهجن السيتوبلازمية (السيبردز)

نجد فى الهجن الجنسية أن الأم تكون هى المصدر الوحيد للسيتوبلازم فى النبات الهجين، هذا بينما يسهم الأبوان بقدر متساو من السيتوبلازم فى حالة الهجن الجسمية

ومع ذلك فإنه يمكن انتاج هجنا جسميه يحصل فيها على النواه من أحد الأبوين، بينما يحصل على السيتوبلازم من كليهما، وبذا تنتج ما تعرف بالهجن سيتوبلازميه cybrids. ومن خلال التحكم في توزيع المادة الوراثيه المحصل عليها من الأبوين في المراحل المبكرة التالية لاندماج البروتوبلاستات، فإنه يمكن توجيه التوزيع بحيث يتحصل على السيتوبلازم من أحد الأبوين بينما يسهم النوع الآخر بالنواة فقط أو بكل من النواه والسيتوبلازم.

وبذا فقد تحول الاهتمام في عملية دمج البروتوبلاست من محاولة إنتاج نباتات جديدة تماما إلى نقل صفات معينة - يصعب نقلها بطرق التربية العادية - من نوع لآخر. وتعطي هجن السيبرد cybrids -- التي تحتوى على نواة من احد النوعين الهجين، وسيتوبلازم من كليهما -- تعطي الفرصه للحصول على حالة من الخلط الوراثي في المادة الوراثيه غير النوويه. هذا مع العلم بأن العضيات السيتوبلازمية - مثل الميتوكوندريا والكلوروبلاستيدات - تحتوى على mt-DNA، و cp-DNA على التوالى، التى تتحكم فى العقم الذكرى السيتوبلازمي، وجهاز البناء الضوئي وكفاءته، وإنزيمات تمثيل الكربون، والمقاومة للاسترتبتومايسين.

ومن أهم الطرق التي استخدمت في إنتاج الـ cybrids، ما يلي:

١ - وقف نشاط نواه أحد النوعين أو التخلص منها بالتعريض لأشعة جاما، أو لأشعة إكس (٩-٥٠ كيلوراد)، أو بالطرد المركزى خلال Percoll gradient، مع اتباع ذلك بالاندماج مع بروتوبلاست كامل من النوع الآخر.

٢ - دمج بروتوبلاست طبيعي مع ما يعرف باسم subprotoplast أو microprotoplast.

٣ - التخلص من كروموسومات أحد النوعين أثناء تكاثر الخلية الهجين بالمعاملة بالمركب iodoacetate الذى يؤدى إلى تثبط الهيئة الكروموسومية النووية.

٤ - استعمال الطفرات ومضادات الأيض (عن Bajaj ١٩٩٤، و Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

عند اللجوء الى الدمج مع التعريض لأشعة جاما (gamma fusion) يوقف نشاط

أحد النوعين (المعطى) بالتعريض لجرعة مميتة أو شبه مميتة من أشعة جاما قبل دمجه مع النوع الآخر (المستقبل). تؤدى تلك المعاملة إلى توجيه عملية التخلص من كروموسومات النوع المعطى — فقط — عند دمج بروتوبلاستات النوعين معًا.

وقد أمكن باتباع هذه الطريقة الحصول على عدد من الهجن غير المتناوقة (asymmetric hybrids) — أى التى لا تحتوى على جرعات متماثلة من المادة الوراثية للنوعين المدمجين معًا — مثل:

Daucus + *Petroselinum*

Physialis + *Datura*

Hyoscyamus + *Nicotiana*

Daucus + *Nicotiana*

Atropa + *Nicotiana*

Citrus cybrids

Potato cybrids

Nicotiana cybrids

Brassiac cybrids

وفى التبغ .. أمكن الحصول على سلالات عقيمة الذكر سيتوبلازميًا فى خطوة واحدة، بينما يتطلب إنتاجها بطرق التربية التقليدية بين ثلاث إلى أربع سنوات (عن Bajaj ١٩٩٤).

ويعنى ذلك أنه يمكن عن طريق إنتج الهجن السيتوبلازمية التى تحتوى على نواة أحد الأبوين وسيتوبلازم الأب الآخر الاستغناء عن نحو ٨–١٢ جيلاً من التلقيحات الرجعية التى يتحتم عملها عند الرغبة فى نقل صفة سيتوبلازمية من أحد التراكيب الوراثية إلى تركيب وراثى آخر (جدول ٤–٨). ومن أمثلة ذلك صفتى: العقم الذكرى السيتوبلازمى (فى الأرز، والطماطم، والكرنبيات، والتبغ)، والمقاومة لبعض مبيدات الحشائش مثل الأترازين (فى *Brassica napus* الذى نقلت إليه من *B. campestris*).

جدول (٤–٨) بعض الصفات الوراثية التي أمكن نقلها عن طريق دمج البروتوبلاست (عن Chawla ٢٠٠٠).

الهجين الجسمي		الصفة المنقولة	
صفات المقاومة للأمراض والآفات وتحمل الظروف القياسية			
Nicotiana tabacum	+ *N. nesophila*	فيرس موزايك التبغ	Tobacco mosaic virus
Solanum tuberosum	+ *S. chacoense*	فيرس إكس البطاطس	Potato virus X
N. tabacum	+ *N. nesophila*	دودة التبغ الترنية	Tobacco horn worm
S. tuberosum	+ *S. brcvidens*	الندوة المتأخرة وفيرس التفاف أوراق البطاطس وفيرس واى البطاطس	Potato leaf roll virus
			Late blight, PLRV and Potato virus Y
S. circalifolium	+ *S. tuberosum*	الفيتوفثورا	*Phytophthora*
S. melongena	+ *S. sanitwongsei*	الذبول البكتيرى	*Pseudomonas solanaccarum*
S. tuberosum	+ *S. commersonii*	تحمل الصقيع	Frost tolerance
B. napus	+ *B. nigra*	قاعدة الساق السوداء	*Phoma lingam*
B. oleracea	+ *Sinapis alba*	ألترناريا	*Alternaria brassiceae*
B. napus	+ *Sinapis alba*	ألترناريا	*Alternaria brassiceae*
Citrus sinensis	+ *Poncirus trifoliata*	فيتوفثورا	*Phytophthora*
Lycopersicon esculentum	+ *L. peruvianum*	فيرس موزايك التبغ. وفيرس الذبول المتبقع. وتحمل البرودة	TMV, spotted wilt virus, cold tolerance
S. lycopersicoides	+ *L. esculentum*	تحمل البرودة	Cold tolerance
Solanum ochranthum	+ *L. esculentum*	بعض أمراض وآفات الطماطم	Tomato diseases and insect pests
Brassica oleracea	+ *B. napus*	العفن الأسود	Black rot (*Xanthomonas campestris*)
B. oleracea spp. *capitata*	+ *B. oleracea* (Ogura CMS line)	تحمل البرودة	Cold tolerance
S. tuberasum	+ *S. commersonii*	تحمل الصقيع	Frost tolerance
R. sativa (Japanese radish)	+ *B. oleracea* var. *batrytis*	الجذر الصولجانى	Club root disease
B. oleracea var botrytis	+ *S. alba* + *B. carinata*	ألترناريا وقاعدة الساق السوداء	*Alternaria brassicala and Phoma lingam*
Citrullus lanatus	+ *Cucumis melo*	الجذر الصولجانى	Club root resistance

تابع جدول (٤-٨).

الهجين الجسمى		الصفة المنقولة	
+ *Daucus carota*	*Hardeum vulgare*	تحمل الصقيع والملوحة	Frost and salt tolcrance
+ *S. sisymbrifolium*	*Solanum melongena*	النيماتودا	Nematode
+ *S. bulbocastanum*	*S. tuberosum*	النيماتودا	Nematode
+ *S. bulbocastanum*	*S. tuberosum*	نيماتودا تعقد الجذور	Root knot nematode
+ *Brassica napus*	*Raphanus sativus*	نيماتودا البنجر المتحوصلة	Beet cyst nematode
+ *R. sativus* + *B. napus*	*Sinapis alba*	نيماتودا البنجر المتحوصلة	Beet cyst nematode
صفات الجودة			
+ *N. tabacum*	*N. rustica*	المحتوى العالى من النيكوتين	High nicotine content
+ *Eruca sativa*	*B. napus*	المحتوى المنخفض من حامض الإيروك	Low erucic acid
الصفات الزراعية:			
+ *N. sylvestris*	*N. tabacum*	مقاومة الاستربتومايسين	Streptomycin resistance
	N. tabacum	مقاومة الترايازين	Triazine resistance
+ *S. tuberosum*	*S. nigrum*	مقاومة الترايازين	Triazine resistance
+ *B. napus*	*B. nigra*	مقاومة الهيجروميسين	Hygromycin resistance
	B. napus	مقاومة الترايازين	Triazine resistance
+ *N. sylvestris*	*N. tabacum*	العقم الذكرى السيتوبلازمى	CMS
+ *B. napus*	*B. campestris*	العقم الذكرى السيتوبلازمى	CMS
+ *N. sylvestris*	*N. tabacum*	العقم الذكرى السيتوبلازمى	CMS
+ *Raphanus sativa*	*B. napus* + *B. campestris*	العقم الذكرى السيتوبلازمى ومقاومة الترايازين	CMS and Triazine resistance
	Oryza spp.	العقم الذكرى السيتوبلازمى	CMS
+ *Solanum acaule*	*L. esculentum*	العقم الذكرى السيتوبلازمى	CMS
+ *B. tournefortii*	*B. napus*	العقم الذكرى السيتوبلازمى	CMS

ومن بين الأمثلة الأخرى على صبن السيبردز، ما يلى:

● أمكن دمج بروتوبلاست خلايا الميزوفيل فى كل من نوع الطماطم البرى *Lycopersicon pennellu* مع بطاطس أحادية مضاعفة dihaploid من صنف نيكولا، بهدف نقل صفه تحمل الملوحة من *L. pennellu* إلى البطاطس وقد أنتجت النباتات الهجين أزهارا وسيقانا أرضية قصيرة ودرنات مشوهة، ولكنها كانت على درجة عالية من العقم، حيث تراوحت حيوية حبوب اللقاح التى أنتجتها بين ٣٪، و ٧٪ وقد تبين من اختبارات تحمل الملوحة أن الهجين أظهر ٥٠٪ من قدرة *L. pennellu* على تحمل الملوحة، بينما لم تنمو نباتات البطاطس مطلقا تحت ظروف الملوحة (Sherraf وآخرون ١٩٩٤)

● أما هجين الطماطم مع البطاطس فقد ظهرت به بعض صفات الأبوين، رغم أنه كان أقرب دائمًا إلى أحدهما ولذا فقد أطلق على الهجين اسم topato، أو pomato حسبما تكون صفاته، أقرب إلى الطماطم، أو إلى البطاطس، على التوالى وقد تكونت لبعض النبتات الهجين درنات صغيرة بيضاء اللون، وأزهار، وثمار، صفراء اللون، لها نكهة الطماطم، إلاّ أن جميع الأزهار كانت عقيمة، وكانت الثمار خالية من البذور (عن Gaynor & Kaur-Shawney ١٩٨٥).

● استخدمت تقنية دمج البروتوبلاست فى الحصول على هجن سيتوبلازم (سيبرد) cybrids بعيدة جدًّا — مثل الهجين بين الجزر (وهو من ذوات الفلقتين)، والأرز (وهو من ذوات الفلقه الواحدة) — وذلك بعد تعريض بروتوبلاستات الجزر — قبل استعمالها فى عملية الدمج — لأشعة إكس وقد احتوى الهجين الناتج على الهيئة الكروموسومية للأرز مع سيتوبلازم من كل من الأرز والجزر (Kisaka وآخرون ١٩٩٤)

هذا وتجدر الإشارة إلى أن نجاح عملية نقل الكلوروبلاستيدات من أحد الأنواع إلى سيبردز cybrids يرتبط سلبيًا مع الـ phylogenetic distance (وهى المسافة التى تفصل النوعين المعنيين عن بعضهما وراثيًا، والتى تقدر بالتحليل الوراثى). ولذا فإنه بينما لا يمكن نقل كلوروبلاستيدات بعض أنواع الجنس *Solanum* البعيدة جدًّا عن البطاطس إلى البطاطس cybrids، فإن كلوروبلاستيدات الأنواع الأقل بعدًا عن البطاطس يمكن نقلها، وتكون فعالة فى cybrids البطاطس (عن Galun وآخرين ١٩٩٤).

استخدامات تقنية دمج البروتوبلاست فى مجال تربية النبات .. إنجازات ومحددات

مجالات استخدام التقنية

استخدمت تقنية دمج البروتوبلاست فى خدمة أهداف تربية النبات فى كل من المجالات التالية:

أولاً: التغلب على حالات عدم التوافق الجنسى

أثبتت تقنية دمج البروتوبلاستات أنها أداة فعالة فى التغلب على مشاكل عدم التوافق الخلطى فى برامج التربية، وقد أمكن الاستفادة من تلك التقنية فى حالات كثيرة نذكر منها ما يلى:

Daucus carota + Petroselinum hortense
Petunia parodii + P. Parviflora
Nicotiana tabacum + Salpiglossis sinuata
Physalis minima + Datura innoxia
Hyoscyamus muticus + Nicotiana tabacum
Solanum tuberosum + S. chacoense
S. melongena + S. nigrum
Lycopersicon + Petunia
Citrus sinensis + Severinia disticha
C. reticulata + Citropis gilletina
Pyrus communis + Prunus avium
Nicotiana tabacum + N. repanda
Lycopersicon esculentum + Solanum muricatum
Brassica napus + B. nigra
B. Napus + Barbarea vulgaris
B. napus + Thlaspi perfoliatum

ثانيًا: إنتاج الـ cybrids (الهجن غير المتساوقة asymetric)

من بين الأنواع النباتية التى أمكن إنتاج cybrids منها تحتوى على هيئتها الكروموسومية الكاملة بالإضافة إلى سيتوبلازمها وسيتوبلازم نوع آخر (بهدف نقل صفات سيتوبلازمية هامة) كلاً من البطاطس، والصليبيات، والأرز، والطماطم، والجزر، والتبغ، والموالح.

ثالثا: المقاومة للأمراض والآفات ومبيدات الحشائش

ترتب على التباين الوراثى الذى تحدثه عملية دمج البروتوبلاستات ظهور حالات من المقاومة أو التحمل لعدد من مسببات الأمراض، والآفات، وظروف الجفاف والبرودة، ومبيدات الحشائش ... إلخ، كتلك المبينة فى جدول (٤-٩)

رابعا: زيادة المحتوى النباتى من الألكالويدات ومنتجات الأيض الثانوية

إن من أهم التطورات التى حدثت مؤخرًا فى الصناعات الدوائية الزيادة فى محتوى النباتات الطبية من الألكالويدات ومنتجات الأيض الثانوية من خلال عملية دمج البروتوبلاست، والتى كان من أهمها ما يلى:

Atropa + Datura

Atropa + Scopolia

Hyoscyamus + Nicotiana

Rauwolfia + Vinca

ولقد أظهرت هجن الداتورة النوعية الجسمية زيادة قدرت بنحو ٢٠-٢٥٪ فى محتواها من الألكالويدات الكلية مقارنة بالآباء. كذلك ظهر تحسن واضح فى الألكالويدات فى الهجين *Duboisia leichhardtii + Nicotiana tabacum*

خامسا: التهجين الجسمى وتحسين الأشجار

إن تربية الأشجار بطرق التربية التقليدية تتطلب سنوات عديدة، وهى مشكلة تزداد تعقيدا بحالات عدم التوافق. وقد حدث تقدم كبير فى تربية الأشجار مع التقدم فى التقنيات الحيوية، حيث أمكن إجراء الإكثار الدقيق لها بأعداد هائلة فى زمن قياسى، وإنتاج نباتات أحادية، وحفظ الجيرمبلازم فى الحرارة الشديدة الانخفاض، وتجديد نمو النباتات من البروتوبلاست، والتحول الوراثى ... إلخ. وأفادت تقنية دمج البروتوبلاست فى إنتاج الـ cybrids والهجن الجسمية — ومن ثم التغلب على مشكلة عدم التوافق فى أنواع مختلفة من الـ *Citrus*، و *Pyrus communis + Prunus avium*، و *Populus koreana + P. nigra*. كذلك فإن الهجن الجسمية فى الـ *Citrus* قد تصبح من أهم

الأصول الجذرية للموالح بما قد توفره من مقاومة للبرودة، والملوحة، ولفحة الموالح، والنيماتودا.

جدول (٤-٩): أنواع نباتية أظهرت مقاومة بعد دمج البروتوبلاست.

المحصول	الأنواع المندمجة معًا	المقاومة أو التحمل
البطاطس والطماطم	*S. chacoense + S. tuberosum*	فيروسات البطاطس
	Solanum nigrum + S. tuberosum	الأترازين Atrazine
	S. brevidens + S. tuberosum	فيرس التفاف الأوراق
	S. torvum + S. tuberosum	الفيرتسيلليم
	S. brevidens + S. tuberosum	الندوة المتأخرة
	Lycopersicon piminellifolium + S. tuberosum	الـ *Erwinia*
	Nicotiana sylvestris + S. tuberosum	أوليجوميسين Oligomycin
	L. esculentum + S. acaule	تحمل البرودة
الصليبيات	*Brassica napus + B. nigra*	*Phoma lingam*
	B. oleracea + B. napus	أترازين
	Eruca + Brassica	الجفاف والحشرات
	Raphanus sativus + B. napus	نيماتودا البنجر المتحوصلة
	Sinapis alba + B. napus	نيماتودا البنجر المتحوصلة
الباذنجان	*Solanum sisymbriifolium + S. melongena*	نيماتودا تعقد الجذور
	S. torvum + S. melongena	الفيرتسيلليم – النيماتودا
	S. nigrum + S. melongena	الأترازين
التبغ	*Nicotiana glauca + N. tabacum*	فيرس موزايك التبغ
	N. tabacum + N. nesophila	دودة التبغ
	N. repanda + N. tabacum	فيرس موزايك التبغ *Meloidogyne arenaria*

سادسًا: التهجين الجسمي بين البروتوبلاستات الأحادية والثنائية

يمكن أن يؤدى الاندماج بين البروتوبلاستات الأحادية والثنائية العدد الكروموسومى إلى إنتاج هجن ثلاثية تكون عقيمة، وقد تكون قادرة على إنتاج ثمار بكرية العقد.

سابعًا: التهجينات الجسمية فى النباتات الدنيئة

لا يختلف نظام دمج البروتوبلاست فى النباتات الدنيئة (الطحالب، والـ

bryophytes، والسراخس ferns) عما فى مغطاة البذور. تستعمل حشائش البحر seaweeds على نطاق واسع كغذاء للإنسان، وخاصة فى اليابان والصين، كما تستخدم فى إنتاج الآجار، والأسمدة، ومكسبات الطعم، وبعض المركبات ذات الأهمية الدوائية. ولذا .. فإن دمج البروتوبلاست قد يكون ذا فائدة كبيرة، وخاصة فى التغلب على مشكلة عدم التوافق الجنسى (عن Bajaj ١٩٩٤).

الإنجازات الهامة

من بين إنجازات الهجن الجسمية، ما يلى:

١ — إعادة تركيب لفت الزيت *Brassica napus*، بدمج *B. campestris* مع *B. oleracea*.

٢ — دمج أنواع من الأجناس الصليبية *Eruca*. و *Sinapis*. و *Raphanus*، و *Moricandia*، و *Diplotaxis* مع أنواع مختلفة من الصليبيات، وأساسًا مع *B napus* وقد أعطت الهجن الجنسية مدى واسعًا من عدد الكروموسومات، وعديدا من الهجن ذات التعدد الكروموسومى غير التام، بالإضافة إلى بعض الهجن ذات التعدد الكروموسومى التام.

وقد أجريت التهجينات الجسمية فى محاولة لنقل صفتى المقاومة للفطر *Alternaria brassicae*، ونيماتودا البنجر المتحوصلة *Heterodera schactii* من *Sinapsis alba*، وصفتى تحمل الجفاف والمنّ من *Eurca sativa*، وصفة المقاومة لنيماتودا البنجر المتحوصلة من الفجل، وصفة الـ low (O_2-compensation point من *Moricandia arvensis*، وصفة العقم الذكرى السيتوبلازمى من كل من *Diplotaxis harra*، و *Brassica tournefortii* .. نقلها جميعًا إلى لفت الزيت.

٣ — تم دمج بورتوبلاست *Arabidopsis thaliana* مع كل من *B. campestris*، و *B. napus*، علمًا بأن النوع الأول ينتمى إلى قبيلة مختلفة عن تلك التى ينتمى إليها النوعين الآخرين. وكانت الهجن الجسمية الناتجة أكثر لاسيمتيرية (أكثر طردًا لكروموسومات أحد النوعين المندمجين) عما فى الهجن الجسمية النوعية أو الجنسية.

٤ — أمكن الحصول على هجن جسمية مزهرة وخصبة بين الأنواع المتوافقة جنسيًا *Medicago sativa* و *M. falcata*، وكذلك بين البرسيم الحجازى و *M. intertexta*.

٥ — حُصِل على هجن جنسية جسمية لكل من التوافيق التالية:

Panicum maximum (+) *Pennisetum americanum*

Saccharum afficinarum (+) *P. americanum*

Oryza sativa (+) *Eichinochloa oryzicola*

Triticum monococcum (+) *P. americanum*

Festuca arundinacea (+) *Lolium multiflorum*

هذا .. إلاّ أن الحصول على نباتات مكتملة النمو لم يكن ممكنًا إلاّ فى التهجين الجسمى الأخير، علمًا بأن هذا الهجين يمكن الحصول عليه جنسيًا كذلك.

٦ — نجحت محاولات التغلب على مشاكل الهجن الجنسية بين الأرز، وبعض الأنواع الأخرى القريبة منه، وهى: *Oryza brachyantha*، و *O. eichingeri*، و *O. officinalis*، و *O. perrieri* وذلك باللجوء إلى الهجن الجسمية، حيث أمكن الحصول على نباتات كاملة مزهرة قادرة على إنتاج حبوب لقاح خصبة فى كل الحالات، فيما عدا فى حالة التهجين مع النوع الأول.

٧ — أمكن الحصول على هجن جسمية بين الباذنجان وكلاً من: *Solanum aethiopicum*، و *S. integrifolium*، و *S. khasianum*، و *S. nigrum*، و *S. sisymbrifolium*، و *S. torvum*، إلاّ أنها كانت على درجة عالية من العقم باستثناء التهجين بين الباذنجان وكلا من النوعين الأول والثانى الذى كان خصبًا فى كل منهما، علمًا بأن الهجين الجنسى فى كلتا الحالتين كان خصبًا كذلك.

٨ — حُصِل على أول نبات هجين جسمى من التهجين بين *Nicotiana glutinosa*، و *N. langsdorffii*، كما حُصِل على هجن جسمية ذات مزايا هامة اقتصاديًا من الاندماج بين *N. tabacum*، و *N. rustica*، حيث أظهرت الهجن محتوى عال من النيكوتين، ومقاومة لكل من عفن الجذر الأسود الذى يسببه الفطر *Thielaviopsis basicola*، والعفن الأزرق الذى يسببه الفطر *Peronospora tabacina*

والغريب فى الأمر أن المقاومة للفطر الأخير لا تتوفر فى أى من الأبوين المهجنين جسميًا، ويبدو أنها ظهرت نتيجة للتفاعل بين التركيبين الوراثيين للأبوين. وقد أمكن كذلك نقل صفة المقاومة للـ TMV إلى هجن تبغ جسمية خصبة من كل من *N. nesophila*، و *N. stocktonii*

٩ — أمكن الحصول على هجن جسمية بين الطماطم والأنواع البرية القريبة التى يصعب تهجينها معها، وهى *L. chilense*، و *L. pennellii*، و *L. peruvianum* كذلك أمكن تهجين الطماطم جسميًا مع نباتات من أجناس أخرى، مثل *N. tabacum*، و *Solanum etuberosum*، و *S. etuberosum* x *S. brevidens*، و *S. lycopersicoides*، و *S. muricatum*، و *S. nigrum*، و *S. rickii*، و *S. tuberosum* ويتميز الهجين الجسمى بين الطماطم و *L. peruvianum* بخصوبته على خلاف الهجين الجنسى بينهما كذلك . فإنه بينما يستحيل إجراء التهجين الجنسى بين الطماطم، و *S. etuberosum*، فإن الهجين الجسمى بينهما كان ممكنًا وخصبًا.

١٠ — اقتُرح فى البطاطس إجراء التربية على سلالات ثنائية التضاعف، ثم إجراء تهجينات جسمية بينها (لاستعادة مستوى التضاعف الرباعى) . اقتُرحت هذه الطريقة كوسيلة بديلة لطرق التربية العادية للبطاطس وقد تم بالفعل فى السنوات الأخيرة إجراء عدد كبير من الاندماجات داخل النوع لهذا الغرض.

١١ — وفى اتجاه مماثل لما سبق بيانه تم — كذلك — دمج بروتوبلاست سلالات بطاطس أحادية متضاعفة مع بروتوبلاستات ثنائية التضاعف لكل من النوع الثنائى *S. phyreja*، وأخرى من الهجين: *S. tuberosum* x *S. phyreja*.

١٢ — أمكن بهذه الطريقة للتربية التنبؤ بمسلك عديد من الصفات فى الهجين، وذلك من واقع تواجدها فى الآباء الأحادية المتضاعفة dihaploid. وقد نقلت الصفات لمقاومة الأمراض أو الآفات، مثل جين المقاومة Ro1 المسئول عن مقاومة النيماتودا *Globodera rostochiensis* الذى نقل من أحد الآباء الأحادية المتضاعفة إلى الهجين، وكذلك نقل الجينات الرئيسية المسئولة عن المقاومة لكل من PVX، و PVY.

وقد أعطت عديد من الهجن محصولاً أعلى من محصول الأصناف القياسية التي قورنت معها.

١٣ – أمكن الحصول على هجن جسمية بين البطاطس وعديد من الأنواع البرية غير المتوافقة مع البطاطس – جزئيًّا أو كليًّا – في التلقيحات الجنسية، وكان من بين هذه الأنواع، ما يلي:

S. bulbocastanum	*S. brevidens*
S. sircaeifolium	*S. chacoense*
S. nigrum	*S. commersonii*
S. torvum	*S. pinnatisectum*

كذلك أمكن الحصول على هجين جسمي مع النوع المتوافق جنسيًّا مع البطاطس *S. berthaultii*

ويعد أكثر الأنواع البرية استعمالاً في دراسات الدمج مع البطاطس النوع الثنائي الذي لا يكوّن درنات: *S. brevidens*، الذي يحمل جينات لمقاومة عديد من الأمراض، مثل PLRV، و PVX، و PVY، والعفن الطري البكتيري (Erwinia soft rot)، وهي التي أمكن نقلها بالفعل منه إلى البطاطس.

ولقد كانت بعض هذه الهجن الجسمية النوعية خصبة وأمكن تهجينها رجعيًّا إلى البطاطس.

كذلك نقلت صفات تحمل البرودة من أنواع مثل *S. brevidens*، و *S. commersonii*، إلا أن الهجن كانت وسطًا بين الأبوين في شدة تحملها للبرودة.

وأظهر الهجين النوعي الجسمي بين البطاطس والنوع *S. circaeifolium* مقاومة لكل من *Phytophthora infestans*، و *Globodera pallida*.

١٤ – أمكن كذلك الحصول على هجن جسمية بين البطاطس وكلا من *Lycopersicon esculentum*، و *L. pimpinellifolium* (عن Waara & Glimelius ١٩٩٥).

إن أكثر محاولات دمج بروتوبلاست البطاطس مع بروتوبلاست أنواع الجنس *Solanum* البرية الثنائية التضاعف أجريت بهدف نقل صفات المقاومة للأمراض، ومن أمثلة ذلك صفات المقاومة لكل من *Phytophthora infestans*، و *Globodera pallida* من النوع *S. circaeifolium*، وفيرس التفاف أوراق البطاطس من *S. brevidens*. كذلك نقلت صفات تحمل البرودة والصقيع من *S. commersonii* (عن Millam وآخرين ١٩٩٥).

المحددات والتحديات

تكون الهجن الجسمية إما متساوقة symmetric (وهى التى تحتوى على الهيئتين الكروموسوميتن الكاملتين لكلا الأبوين)، وإما غير متساوقة asymmetric (وهى التى تحتوى على هيئة كروموسومية كاملة من أحد الأبوين، بينما يكون الأب الآخر ممثلاً ببعض كروموسوماته فقط، وقد تفقد بعض الكروموسومات من كلا الأبوين فى الهجين) وجدير بالذكر أن عدم التساوق الكروموسومى أمر عشوائى يحدث تلقائيًا ولا يمكن التنبؤ به، وهو لا يقتصر على الجينات النووية فقط، حيث قد يحدث — كذلك — فى الجينات السيتوبلازمية. ويزداد الاهتمام حاليًا بالهجن غير المتساوقة كروموسوميًا، بهدف إنتاج هجن جسمية سيتوبلازمية (cybrids)؛ لأجل نقل صفات سيتوبلازمية هامة (مثل العقم الذكرى السيتوبلازمى، والمقاومة للأمراض، وتحمل مبيدات الحشائش) فى خطوة واحدة.

هذا ولا يمكن استعمال الهجن الجسمية المتساوقة symmetric بصورة مباشرة كأصناف جديدة من المحصول المراد تحسينه نظرًا لاحتواء تلك الهجين على الهيئة الكروموسومية الكاملة للنوع الآخر المستخدم فى التهجين؛ الأمر الذى يستدعى إجراء التهجين الرجعى لعدة أجيال مع التقييم المستمر قبل التوصل إلى صنف جديد مقبول زراعيًا. وفى المقابل .. فإن الهجن الجسمية غير المتساوقة asymmetric — وهى التى يحصل عليها بمعاملة بروتوبلاستات النوع المعطى بأشعة إكس — تحتوى فقط على كروموسوم واحد أو كروموسومين من النوع المعطى؛ الأمر الذى يقود إلى إنتاج صنف تجارى يحتوى على صفة أو صفات جديدة مرغوب فيها دونما حاجة إلى مزيد من

الجهد فى تربيته. أما إذا أمكن استبعاد جميع كروموسومات النوع المعطى مع نقل سيتوبلازمه فقط، فإن الهجين السيتوبلازمى cybrid الناتج قد يحتوى على صفات سيتوبلازمية مرغوب فيها مثل صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى (عن Millam وآخرين ١٩٩٥).

إن عدم التطابق incongruity بين مكونات الاندماج الجسمى لخلايا الطماطم مع خلايا البطاطس أو خلايا التبغ لم يسمح بإنتاج cybrids حقيقية أو هجن جسمية خصبة، مما يدل على أهمية كل من تفاعل السيتوبلازم مع النواة، وتفاعل النواة مع النواة فى تلك الحالات. ومن أهم مشاكل محاولات دمج بروتوبلاستات الأنواع البعيدة عن بعضها تقسيميًا ضعف خصوبة الهجن وعدم حدوث اقتران يذكر بين كروموسومات الأبوين. وفى حالة التهجين الجسمى بين الطماطم والبطاطس أمكن الحصول على نسل خصب بمعدل منخفض حينما تمت زراعة أعداد كبيرة من الأجنة بعد التهجين الرجعى للهجين السداسى التضاعف (طماطم ٢ن + بطاطس ٤ن) مع البطاطس الرباعية (عن Wolters وآخرين ١٩٩٤).

وغالبًا ما تكون الهجن الجسمية الناتجة عن دمج بروتوبلاستات أنواع نباتية بعيدة عن بعضها البعض تقسيميًا .. غالبًا ما تكون عقيمة، ونادرًا ما تستعمل الهجن الجسمية بصورة مباشرة، مثلما حدث عند إعادة تركيب النوع الهجينى المتضاعف *Brassica napus*، وكذلك عندما أنتجت أصناف بطاطس رباعية التضاعف خليطة وراثيًا بدمج سلالات أحادية متضاعفة، واستعمال الهجن الجسمية لأشجار الفاكهة كأصول جذرية.

ويهتم المربى بالطرق التى تتبع لأجل الحد من المادة الوراثية التى تنقل من الأنواع البرية إلى الهجن الجسمية التى تنتج من اندماجها مع الأنواع المزروعة، وهو أمر قد يتحقق بالتخلص من كروموسومات كاملة من بين التى حُصل عليها من النوع البرى، إلاّ أن هذه العملية تكون عشوائية، حيث لا يمكن التنبؤ بالكروموسومات التى يتم فقدها (عن Waara & Glimelius ١٩٩٥).

ويمكن تلخيص أهم المحددات والتحديات التى تواجه إنتاج الهجن الجسمية والاستفادة منها، فيما يلى:

١ -- تتطلب الاستفادة من عملية دمج البروتوبلاست توفر نظام كفء لتجديد النمو من لبروتوبلاستات وعلى الرغم من أن دمج بروتوبلاستات أى نوعين أمر ممكن، فإن إنتاج نباتات هجين لم يكن ممكنا إلا فى حالات خاصة

٢ -- إن عدم توفر وسيلة فعالة للانتخاب بين البروتوبلاستات المندمجة يعد أحيانا مشكلة كبيرة

٣ غالبًا ما تكون نواتج دمج البروتوبلاستات غير متوازنة (عقيمة، أو مسوهة، أو غير ثابتة)، ومن ثم تكون غير خصبة ولا يمكن إكثارها جنسيًا

٤ كثيرًا ما يتكون نمو كالوسي كيميرى فى مكان الهجن، ويرجع ذلك — عادة — إلى عدم اندماج الأنوية بعد اندماج الخلايا وانقسامها كل على انفراد

٥ — يؤدى دمج نوعين ثنائيين إلى الحصول على تراكيب متضاعفة هجينيًا amphidiploid، وهو أمر لا يكون — عادة — مرغوبا فيه، ولذا يفضل فى كثير من الأحيان دمج بروتوبلاستات النباتات الأحادية.

٦ - كثيرا ما تكون النباتات الناتجة من عملية التهجين الجسمي شديدة التباين

٧ لا يمكن أبدا الجزم بأن صفة معينة مطلوبة سوف يتم التعبير عنها بعد التهجين الجسمي

٨ -- يكون الثبات الوراثى أثناء زراعة البروتوبلاست ضعيفا

٩ — لكى يمكن الاستفادة من ناتج عملية دمج البروتوبلاست فى برامج التربية فإن الهجن الجسمية التى تحتوى على خليط من الجينات من نوعين مختلفين يجب أن تكون قادرة على التكاثر الجسمى، لأنه يلزم فى الغالبية العظمى من الحالات تهجينها رجعيًا إلى النوع المزروع، وعلى الرغم من ذلك فإن عددًا كبيرًا من الهجن الجسمية النوعية والغالبية العظمى من الهجن الجسمية الجنسية تكون عقيمة تماما (عن Chawla ٢٠٠٠)

مصادر إضافية

من بين المصادر الإضافية التى يمكن الرجوع إليها بخصوص مزارع البروتوبلاست والهجن الجسمية، ما يلى:

المرجع	الموضوع
Vasil (١٩٨٠)	التحديات والتقدمات في مجال أبحاث البروتوبلاست
Vasil & Vasil (١٩٨٠)	عزل البروتوبلاست وزراعته
Cooking (١٩٧٥، و ١٩٨٣)	استخدام مزارع البروتوبلاست فى إنتاج الهجن البعيدة
Sink (١٩٨٤)	دمج البروتوبلاست لتحسين النباتات
Lorz (١٩٨٥)	دمج مختلف عضيات الخلية فى خلايا نباتات أخرى
Power & Chapman (١٩٨٥)	عزل البروتوبلاست وزراعته
Gaynor & Kaur-Shawhney (١٩٨٥)	إنتاج محاصيل جديدة عن طريق دمج البروتوبلاست
Veilleux وآخرون (٢٠٠٥)	استخدام مزارع البروتوبلاست فى تحسين النباتات



الفصل الخامس

تباينات المزارع

تمهيد

تعتبر مزارع الأنسجة النباتية فى الوقت الحاضر أحد المصادر الهامة للحصول على تباينات وراثية مفيدة. وقد أطلق على التباينات التى تظهر مع دورات زراعة الأنسجة اسم تباينات السلالات الجسمية somaclonal variation بواسطة Larkin & Scowcroft (١٩٨١)، وهى ظاهرة لها عيوبها، كما أن لها مزاياها. فبالنسبة للحالات التى يعد الثبات الوراثى فيها أمرًا حيويًا (كما فى الإكثار الدقيق، والهندسة الوراثية). فإن تباينات المزارع تعد مشكلة كبرى. ومن ناحية أخرى .. فإن تلك التباينات تعد مصدرا جديدا للاختلافات الوراثية التى قد تلعب دورًا فى تحسين النباتات.

قد تكون تباينات سلالات المزارع - الخضرية - somaclonal variations وراثية genetic أو ترجع لأسباب تتعلق بعملية الزراعة فى البيئة الصناعية epigenetic، وتعبر التغيرات الأخيرة عن ذاتها فى مرحلة النمو الخلوى، ولكنها تختفى — عادة — حين تجديد النمو النباتى منها، أو إكثارها جنسيًا.

يُشير مصطلح تباينات المزارع إلى التباينات التى تظهر فى مزارع الخلايا، وفى النباتات التى يتجدد نموها من المزارع وفى أنسالها.

هذا .. إلاّ أن نوعيات أخرى من التباينات تظهر فى مزارع خاصة للخلايا أو للأنسجة. وتتضمن ما يلى:

نوع المزرعة	كنية التباينات
البروتوبلاست protoplasts	Protoclonal
المتوك والخلايا الأمية للجاميطات anthers & microspores	Gametoclonal
الكالس callus	Calliclonal
الميرستم القمى apical meristem	Mericlonal
الأنسجة الجسمية كأنسجة الأوراق، والساق، والجذور ... إلخ.	Somaclonal

وتتعدد المسببات في ظهور التباينات الوراثية لمزارع الأنسجة، ولعل أبرزها مجرد تعبير التباينات التي كانت موجودة أصلاً في الأجزاء النباتية المزروعة explants عن ذاتها. إضافة إلى ظهور التحورات الكروموسومية، وتنشيط ما يعرف باسم العناصر المتنقلة transposable elements، وهي التي تتحكم في ظهور بعض الصفات

ومن أهم العوامل التي تتحكم في معدل ظهور تباينات المزارع التركيب الوراثي للجزء النباتي المزروع explant، ونوع مزرعة الأنسجة، فبعض التراكيب الوراثية وحتى بعض الأنواع النباتية — تكون أكثر عرضة لظهور هذه التباينات فيها عن غيرها، كما أن المزارع التي يتجدد فيها النمو (أي يحدث فيها regeneration) من نسيج كالس callus tissue تعد مصدرًا دائمًا للتباينات الوراثية الجديدة. وغالبًا ما تكون تلك التباينات ثابتة ويستمر ظهورها جيلاً بعد جيل

ويتم تحفيز حدوث تباينات المزارع والتعرف عليها، كما يلي:

١ — زراعة الكالس أو معلق الخلايا لعدة دورات.

٢ - تجديد النمو النباتي من تلك المزارع القديمة.

٣ -- التقييم للصفات المرغوب فيها في النباتات التي يتجدد نموها وفي أنسالها

يمكن الانتخاب في المزارع ذاتها للتباينات الخاصه بتحمل ظروف الشدّ البيئي والحيوي، باستعمال مستويات سامة من سموم مسببات الأمراض، ومبيدات الحشائش، والأملاح إلخ.

٤ — اختبار التباينات المنتخبة في الأجيال التالية.

٥ — إكثار التباينات المنتخبة التي تبقى ثابتة وراثيًا، لأجل إنتاج سلالات تربية جديدة (عن Brar & Jain ١٩٩٨).

إن أكثر الاستراتيجيات نجاحًا في عملية الانتخاب للمقاومة للأمراض في المزارع هي التي تجرى باستعمال إما سموم الكائنات المرضة ذاتها، وإما الراشح النقي لمزارع تلك الكائنات هذا مع العلم بأن كثيرًا من الفطريات الاختيارية التطفل والبكتيريا المرضة تنتج سموما ذات وزن جزئيي منخفض في كل من المزارع والعائل ويستدل من إحداث

الكائن المرض لاصفرار أو تحلل فى عائل مصاب على إنتاجه لسموم تُحدث تلك الأغراض.

وحقيقة الأمر أن تباينات المزارع تُعد من الطفرات، ولا يمكن التحكم فى ظهور طفرات معينة دون غيرها، حيث يكون ظهورها عشوائيًا، ويكون معظمها — مثل معظم الطفرات — بغير ذى جدوى اقتصادية. هذا .. إلاّ أن أهميتها فى مجال تحسين النباتات ترجع إلى السهولة التى تظهر بها تلك التباينات، والسهولة التى يمكن بها الانتخاب لبعضها فى المزارع (عن McCown ٢٠٠٣) كما سيأتى تفصيله فى هذا الفصل.

وللتدليل على أهمية مزارع الأنسجة كمصدر للتباينات الوراثية إذا أمكن الانتخاب بسهولة للصفات المرغوب فيها .. ذكر Chawla (٢٠٠٠) أنه أمكن الانتخاب لمستوى عالٍ جدًّا من المقاومة للـ T-toxin الخاص بالفطر *Helminthosporium maydis* فى سلالات الذرة Tms — القابلة للإصابة بالفطر أصلاً — وذلك بإعادة زراعة مزارع الكالس المتحصل عليها من الأجنة — عدة مرات — على بيئة تحتوى على جرعة عالية غير مميتة من سُمِّ الفطر. وقد كانت النباتات التى حُصل عليها من تلك المزارع مقاومة تمامًا لسُمِّ الفطر، وانتقلت الصفة إلى نسل تلك النباتات.

ويبين شكل (٥-١) تخطيطًا لحث تكوين تباينات المزارع وانتخابها.

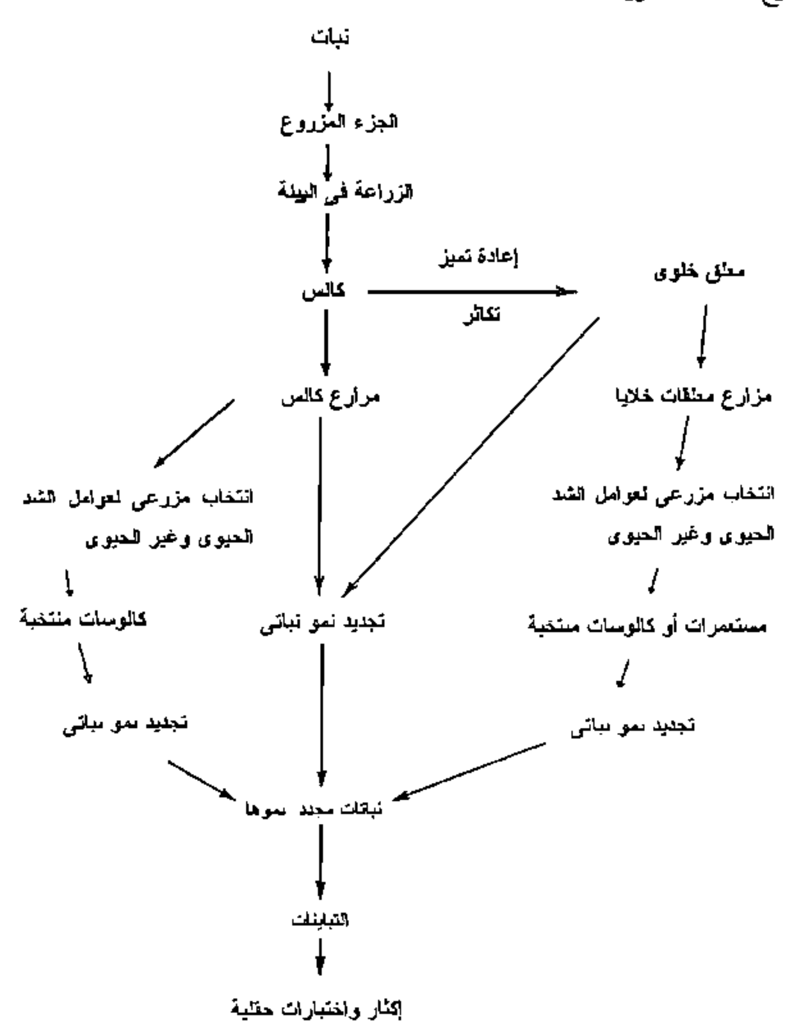
هذا وتقسم تباينات المزارع إلى فئتين رئيسيتين، هما:

١ — تباينات لا تورث epigenetic.

٢ — تباينات وراثية (تورث) genetic.

يكون معدل حدوث تباينات المزارع الوراثية genetic variation أقل بكثير من معدل ظهور التباينات الـ epigenetic. وبينما تكون التباينات الوراثية على درجة عالية من الثبات، فإن التباينات الـ epigenetic قد تكون ثابتة لبعض الوقت، إلاّ أن الصفات الجديدة غالبًا ما تعود إلى حالتها الأصلية فى الظروف التى لا يحدث فيها انتخاب لتلك التباينات الجديدة. كذلك فإن الصفات الـ epigenetic غالبًا ما تنتقل إلى النسل من خلال الانقسام الميتوزى، ولكن نادرًا ما يحدث ذلك من خلال الانقسام الميوزى.

ويتناسب معدل ظهور التباينات الـ epigenetic طرديًا مع شدة الانتخاب التي تتعرض لها المزارع لأجل ظهور تلك التباينات.



شكل (٥-١): تخطيط للطريقة التي يمكن بها حث تكوين تباينات المزارع وانتخابها

تباينات المزارع غير الوراثية

تعرف التباينات التي لا تورث (الـ epigenetic) – كذلك – باسم التباينات التطورية developmental variation، وهي تتضمن تغيرات في الشكل المظهرى تدوم

لفترة، وتنتج عن تغيرات فى تعبير بعض الجينات، كالجين المسئول عن تكوين لأشواك فى طور الحداثة فى الموالح، فيلاحظ أن الأجزاء النباتية المزروعة — والمأخوذة من نباتات مكتملة النمو وناضجة — تتأقلم على الزراعة فى البيئات الصناعية بأن تصبح أكثر حداثة بصورة مضطردة؛ الأمر الذى يستمر حتى وقت تجديد النمو . وهنا تكون حالة النمو الجديد — من حيث مدى اكتمال النمو أو درجة الحداثة فيه — متوافقة مع وضع الحداثة فى المزرعة وقت تجديد النمو. كذلك فإن مزارع الكافور قد تعطى نموات جديدة ذات أوراق جالسة، وهى إحدى صفات الحداثة هذا إلا أن تلك الصفات تختفى بمرور الوقت ويتوقف ظهورها لتحل محلها صفات النباتات التى أخذت منها الأجزاء التى استخدمت فى الزراعة

ومن أبرز الأمثلة على تغيرات المزارع غير الموروثة فقد الكالس لاحتياجاته من الأوكسينات، أو السيتوكينينات، أو الفيتامينات، وهى الظاهرة التى تعرف باسم التعود habituation النسيجى أو الخلوى. ومن أمثلة التغيرات الأخرى غير الموروثة قوة النمو الكبيرة خارج بيئة الزراعة؛ الأمر الذى قد يكون مرده إلى الارتداد لحالة الحداثة أو إلى التخلص من الإصابات الفيروسية. يستمر ذلك النمو القوى لحين الإزهار، حيث يعود النبات بعدها إلى الشكل المظهرى للنبات الأصلى الذى أخذ منه الجزء الذى استخدم فى الزراعة وقد حاولت المشاتل التجارية الاستفادة من تلك الظاهرة بإنتاج بادرات قوية النمو يسهل شتلها، وتنمو سريعًا كذلك يُعتقد بأن التقزم المؤقت هو من بين التباينات التى لا تورث، والتى قد يكون مردها إلى ما تحمله نباتات المزارع معها من منظمات النمو التى حصلت عليها من بيئة الزراعة، وغالبًا ما تعود تلك النباتات إلى نموها الطبيعى بعد موسم نمو واحد (عن Skirvin وآخرين ١٩٩٤)

ولقد اقترح أن مجرد تعرض الخلايا للصدمات — كما هو الحال فى مزارع الأنسجة — فإنها قد تشهد تغيرات فى التعبير الجينى يختلف عما يكون عليه الحال فى الظروف الطبيعية؛ مما يؤدى إلى ظهور تغيرات مورفولوجية فى النباتات التى يتجدد نموها من تلك المزارع (عن Jain ٢٠٠١).

تعبر التغيرات الـ epigenetic — غالبًا — عن تحورات فى التعبير الوراثى أكثر منها تغيرات فى التركيب الجينى

وتعود تلك التغيرات الـ epigenetic – غالبًا – إلى ثلاثة أحداث خلوية، هي:

١ – التضخيم الجينى gene amplification.

٢ – مثلمة الدنا DNA methylation.

٣ – زيادة فى نشاط العناصر التى تغير وضعها transposable elements

يعتقد بأن زيادة التعبير الجينى تحت ظروف الشدِّ الانتخابى العالى – فيما يعرف بالتضخيم الجينى – يعد أحد الوسائل الرئيسية لظهور التباينات الـ epigenetic التى تختفى تدريجيًا بزوال عامل الضغط الانتخابى المؤثر.

ويقدر أن نحو ٢٥٪ من الهيئة الوراثية لأى نبات يمكن أن يحدث بها مثلمة methylation فى مواقع السيتوسين cytosine وعلى الرغم من أن أهمية ذلك العامل ليست معلومة، فقد اقترح أن حدوث methylation، و demethylation للدنا هو أحد الوسائل التى يمكن عن طريقها التحكم فى النشاط النسخى transcriptional activity للدنا، علمًا بأن حدوث الـ methylation والـ demethylation أمر تحفزه ظروف بيئات المزارع

أما الزيادة فى نشاط العناصر التى تغير وضعها فإنها تحدث بوضوح فى مزارع الأنسجة حيث تظهر عناصر elements وراثية قادرة على التحرك حول الهيئة الوراثية، بما يؤثر بشدة على عملية تنظيم عمل الجينات gene regulation، ويزداد تحرك تلك العناصر فى المزارع (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢)

تباينات المزارع الوراثية والأساس الوراثى لظهورها

تتميز مزارع الخلايا بأن كل خلية فيها يكون لها القدرة على أن تصبح فردا جديدًا، ويعنى ذلك وجود احتمالات كبيرة للغاية، لظهور الطفرات فى النباتات التى تتميز من هذه المزارع نظرا للأعداد الهائلة من الخلايا التى توجد بها فعلى سبيل المثال يحتوى كل ١٠٠ مل من مزرعة معلق خلايا التبغ على أكثر من ١ × ١٠^٧ خلية ولا يحتاج الأمر إلى أكثر من تطوير طريقة مناسبة لتقييم هذه الخلايا للصفة أو الصفات المرغوب فيها، بحيث لا تبقى فى المزرعة سوى الخلايا المحتوية على الطفرات المرغوبة ثم توفير الظروف التى تساعد على تميز الأجنة من هذه الخلايا المطفرة

تحدث التغيرات الوراثية — تلقائيًا — في جميع أنواع المزارع تقريبا، وتعرف – كما أسلفنا – باسم Somaclonal Variation. وقد أمكن التعرف على اختلافات وراثية في صفات المقاومة للأمراض، وعدد الأيام إلى الإزهار، والمحصول، وحجم النبات، وشكل الجزء الاقتصادى من النبات .. إلخ، ولوحظت هذه التباينات في مزارع محاصيل متنوعة، مثل قصب السكر، والبطاطس، والتبغ، والأرز، والذرة، والشعير، والبرسيم، والجزر، والأناناس، والخس، والثوم، والصليبيات، والقرنفل .. إلخ (عن Carlson وآخرين ١٩٨٤، و Daub ١٩٨٤)

ويمكن إرجاع الأساس الوراثى لتباينات المزارع لأى من الأسباب التالية:

١ — حدوث تباينات على المستوى الكروموسومى

كثيرًا ما تحدث في مزارع الأنسجة تغيرات في كل من أعداد الكروموسومات وتركيبها؛ فالتضاعف الكروموسومى التام وغير التام أمر عادى، كما تظهر الكثير من التغيرات الكروموسومية التركيبية، مثل حالات النقص، والإضافة، والانقلاب والانتقال. وبينما تكون تلك التغيرات الكروموسومية الكبيرة واضحة بسهولة عند الفحص المجهرى، فإن التغيرات الصغيرة جدًا — التي لا يسهل رؤيتها — قد تكون أكثر حدوثًا وأكثر تأثيرًا على التركيب الوراثى.

وعلى الرغم من أن حالات التعدد الكروموسومى غير التام aneuploidy نادرًا ما تظهر في الطبيعة إلا في النباتات المتضاعفة بطبيعتها إلاّ أنها كثيرة الشيوع في مزارع الأنسجة، وظهرت في مزارع عديد من النباتات؛ مثل البسلة، والتبغ، والجزر، والفول. كما تنشأ حالات كثيرة من التعدد الكروموسومى غير التام، والتام في مزارع متوك بعض النباتات مثل الداتورة، والشعير، والأرز، والبيتونيا.

كما أمكن إحداث التضاعف الذاتى بسهولة في مزارع الخلايا؛ بإضافة الكولشيسين إليها مباشرة فأمكن — على سبيل المثال — إنتاج ٤٨٠ نباتًا متضاعفًا بانتظام من مزرعة خلايا لأحد الهجن النوعية في الجنس *Saccharum* كان قد أضيف إليها الكولشيسين بتركيز ٥٠ مجم/لتر لمدة ٤ أيام. ويحدث التضاعف الكروموسومى الطبيعى بانتظام كذلك

فى كثر من مزارع الخلايا، وكثيرا ما وجدت حالات تضاعفت فيها الخلايا الثنائية إلى ٤ن، و ٨ن، وأحيانًا إلى ١٦ ن

ولقد ظهرت نباتات رباعية التضاعف بين نباتات القاوون التى تجدد نموها فى المزارع من كل من الأجنة الجسمية، والنموات الخضرية العرضية adventitious shoots، ومبادئ النموات الخضرية shoot primprdia، وذلك بنسبة ٣١٪، و ٣٠٪، و ٤٪ على التوالى، بينما لم تظهر أى نباتات رباعية التضاعف بين تلك التى تكاثرت من البراعم الجانبية axillary buds (Ezura وآخرون ١٩٩٢).

يحدث التضاعف فى نباتات المزارع نتيجة للتضاعف الذاتى أو لاندماج مكونات الأنوية، ويتضمن التباين الكروموسومى كلا من التضاعف الكروموسومى غير التام والتام قد تحدث حالات التضاعف غير التام نتيجة لعدم الانفصال الكروموسومى non-disjunction، أو لاختلال فى تكوين خيوط المغزل، أو نتيجة لحدوث كسور كروموسومية يترتب عليها تكوين كروموسومات عديمة السنترومير أو ذات سنترومين ومن المعتقد أن التحكم الطبيعى فى دورة الخلية — الذى يمنع انقسام الخلية قبل اكمال انقسام الدنا — هذا التحكم يختل فى مزارع الأنسجة، مما يؤدى إلى حدوث كسور كروموسومية، تؤدى بالتالى إلى ظهور حالات الاقتضابات deletions، والازدوجات duplications، والانقلابات inversions، والانتقالات الكروموسومية translocations وهذه الكسور الكروموسومية تكون غير عشوائية، حيث تتضمن المناطق الكروموسومية التى تتأخر فى الانقسام وهى التى تحتوى على الكروماتين الخامل heterochromatin وقد تؤدى الكسور الكروموسومية إلى تكون طفرات بصورة مباشرة من خلال إحداثها لظاهرة التأثير الموضعى position effect، أو تحريرها للتعبير الجينى بسبب ما تحدثه الكسور من إعادة ترتيب للمواضع الكروموسومية فى أماكن قريبة من مناطق كروموسومية خاصة ذات كروماتين خامل كذلك فإن التغيرات فى مستوى مثلمة الدنا DNA methylation يمكن أن تحفز حدوث الكسور الكروموسومية

وتختلف درجة عدم الثبات الكروموسومى فى مزارع الأنسجة من نوع نباتى لآخر.

كما تتأثر حالة عدم الثبات الكروموسومى – كذلك – بعمر الكالس، فكلما ازداد عمره كلما ازدادت درجة عدم الثبات

٢ – العبور الجسمى:

تزداد حالات العبور الجسمى somatic crossing over فى ظروف مزارع الأنسجة، كما تزداد فيها – كذلك – حالات التبادل غير المتناظر asymmetric بين الكروموسومات غير المتماثلة non-homologus أثناء الانقسام الميتوزى، الأمر الذى قد يؤدى إلى حدوث نقص أو تكرار فى أجزاء من الكروموسومات يمكن أن تنعزل فى الانقسامات الميتوزية التالية.

كما قد يتسبب العبور الميتوزى mitotic crossing over فى ظهور بعض التباينات الوراثية التى تقود إلى تعبير بعض الجينات المتنحية عن ذاتها نتيجة لتواجدها فى تراكيب عبورية أصيلة.

٣ – تكوين الطفرات العاملية.

تكون بعض التغيرات المورفولوجية التى تظهر فى النباتات التى يتجدد نموها من مزارع الأنسجة عبارة عن طفرات عاملية بسيطة قد تكون سائدة أو متنحية، وبسيطة أو كمية، ولكنها تكون غالبًا بسيطة ومتنحية وقد أوضحت الدراسات التى أجريت على المستوى الجزيئى للدنا أن تلك التغيرات تكون فى الموقع الجينى ذاته، ولا يكون مردها إلى أى فقد أو إضافة كروموسومية.

لا تعبر الطفرات العاملية البسيطة المتنحية عن ذاتها فى الجيل الذى يحدث فيه تجديد النمو (R_0)، ولكنها تظهر فى الجيل التالى – الناتج من التلقيح الذاتى – (R_1) بنسبة ٣:١.

ومن أمثلة الطفرات المتنحية التى ظهرت فى مزارع الأنسجة حالات المقاومة للذبول الفيوزارى التى ظهرت فى مزارع الطماطم، وحالات تحمل بعض مبيدات الحشائش (chlorsulfuron، و sulfometuron methyl) التى ظهرت فى مزارع التبغ، كما أمكن التعرف على ١٣ طفرة يتحكم فى كل منها جين واحد فى ٢٣٠ نباتًا تجدد نموها من مزارع أنسجة الطماطم.

٤ — التغيرات فى دنا عضيات الخلية (التغيرات الوراثية السيتوبلازمية)

تتضمن التغيرات السيتوبلازمية الوراثية دنا الميتوكوندريات، كما هو معروف بالنسبة للحساسية لسم السلالة T من الفطر *Drechslera maydis* مسبب مرض لفحة الأوراق الجنوبية في الذرة، التي توجد فى كل التراكيب الوراثية للذرة التى تحتوى على سيتوبلازم سلالة تكساس العقيمة الذكر cms-T، فهاتان الصفتان على درجة عالية من الارتباط ويتحكم فيهما دنا الميتوكوندريا. ولقد أمكن الحصول من مزارع الأنسجة على طفرة غير حساسة لسم الفطر ولكنها كانت — كذلك — خصبة الذكر كذلك تحدث الطفرات فى دنا الكلوروبلاستيدات، ولكن بنسبة أقل مما تحدث به فى الميتوكوندريات

٥ — تغيرات وراثية من نوعية الـ deamplification (تصغير)، والـ amplification (تضخيم) للفعل الجينى، وتنشيط العناصر المتنقلة transposable elements الذى يدفع الجينات التى كانت فاقدة التأثير (الساكتة) silent إلى إظهار تأثيرها. والـ methylation والـ demethylation للدنا، كما يلى:

أ — مضاعفة وتضخيم الدنا DNA amplification:

يؤدى تضاعف وتضخيم الدنا إلى زيادة إنتاج الرنا الرسول mRNA والبروتين الذى تُنتجه الجينات المكونة لذلك الدنا، وذلك أمر قد يحدث فى تباينات المزارع، كما ظهر فى تباينات المقاومة لمبيدات الحشائش فى مزارع أنسجة البرسيم الحجازى

ب — عناصر (الدنا) المتحركة transposable elements

إن عناصر الدنا المتحركة هى أجزاء من الدنا يمكنها التحرك من مكان لآخر فى الهيئة الكروموسومية، ويمكن أن يؤدى انفصال تلك الأجزاء عن أماكنها وإعادة التصاقها فى مكان آخر من نفس الكروموسوم أو فى كروموسوم آخر إلى احتمال إحداثها لتأثيرات مباشرة على تعبير الجينات المجاورة لها

جـ - مثلمة الدنا DNA methylation.

يمكن أن يكون التباين فى مدى تشبع الدنا بالميثانول عاملاً رئيسيًا فى حدوث الطفرات فى المزارع، إذ إنه يمكن أن يؤخر انقسام الكروماتين الخامل heterochromatin، مما يترتب عليه حدوث كسور كروموسومية وتغيرات فى التعبير الجينى.

كما أن مثلمة الدنا يمكن أن يزيد من إحداث التباينات فى الصفات الكمية بسبب احتمال تأثيره على عديد من الجينات فى آن واحد هذا إلا أن التباينات الناجمة تكون من النوع الـ epigenetic، ولا يترتب على مثلمة الدنا سوى حالة من عدم الثبات الوراثى (عن Brar & Jain ١٩٩٨، و Jain ٢٠٠١، و Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

أمثلة لبعض أنواع تباينات المزارع

جَمعت التباينات الوراثية التى ظهرت فى مزارع الأنسجة لمختلف الأنواع المحصولية بين الصفات النوعية والكمية، ومن أمثلتها ما يلى

١ — العقم الذكرى فى الذرة.

٢ — المحتوى البروتينى المرتفع فى كل من الأرز والترتيكيل

٣ — محتوى السكر المرتفع فى قصب السكر

٤ - التبكير فى الذرة

٥ — التغيرات فى طول النبات، والسفا، وعدد الخلفات، ولون الحبوب، وموعد ظهور السنابل، والبروتين الجلوتينى gliadin protein، والألفا أميليز فى القمح

٦ — تحمل مبيد الحشائش أترازين atrazine فى الطماطم والذرة، والجلايفوسيت فى التبغ

٧ — المقاومة للأمراض فى الذرة، وقصب السكر، والمسترد، والبطاطا

٨ — تحمل الملوحة فى الأرز.

٩ — ارتفاع محتوى الليسين والمثيونين فى الحبوب

١٠ — زيادة قوة نمو البادرات فى الخس.

١١ — انعدام المفصل فى عنق ثمار الطماطم (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

ولقد أمكن العثور على تباينات مرغوب فيها فى مختلف أنواع المزارع، كما يتبين من الأمثلة التالية:

أ — مزارع الخلايا والكالس

انتخبت سلالات طفرية كثيرة من مزارع الخلايا سواء أكان ذلك بعد تعريض المزارع للعوامل المطفرة، أم بدون ذلك التعريض. وكانت أبسط طرق الانتخاب

وأكثرها شيوعًا هى الانتخاب المباشر بتعريض مزرعة الخلايا لمستويات عالية — إلى درجة السمية — من مركبات معينة، بحيث لا تتبقى فى المزرعة سوى الخلايا المقاومة لهذه المركبات، لتتكاثر، وتصبح سلالات طفرية جديدة. ويمكن التأكد من مستوى المقاومة فى هذه الطفرات بإعادة زراعة السلالات الطفرية فى مستويات أعلى من هذه المركبات وقد أمكن — باتباع هذه الطريقة — انتخاب طفرات مقاومة لمشابهات الأحماض الأمينية، ومضادات الحيوية، ومبيدات الحشائش، وسموم الفطريات، والبكتيريا المرضية، وكلوريد الصوديوم .. إلخ، وكذلك سلالات أعلى فى القيمة الغذائية ويعيب هذه الطريقة عدم صلاحيتها للانتخاب لعديد من الصفات المحصولية المهمة

وتجدر الإشارة إلى كثرة ظهور الطفرات فى مزارع الخلايا والكالس، دون الحاجة إلى تعريضها للعوامل المطفرة كما لم يمكن — فى بعض الحالات — زيادة معدل حدوث الطفرات بمعاملة مزارع الأنسجة بالعوامل المطفرة. ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع يراجع Gonzales & Widholm (١٩٨٥).

٢ مزارع البروتوبلاست.

برغم أن مزارع البروتوبلاست تعد أكثر من مزارع الخلايا والكالس ثباتا من الوجهة الوراثية . إلا أنه تظهر بها أيضًا بعض التغيرات الوراثية التى تعطى عند إكثارها سلالات جديدة، يطلق عليها اسم Protoclones. وقد انتجت بهذه الطريقة سلالات جديدة من صنف البطاطس رصت بربانك Russet Burbank تميزت باختلافات نوعية وكمية عن الصنف الأصلى. وتكمن المشكلة الحقيقية لمزارع البروتوبلاست فى قلة الأنواع النباتية، التى أمكن تمييز نباتات كاملة منها (عن Sink ١٩٨٤). ولمزارع البروتوبلاست أهميتها الكبيرة فى إحداث التباينات الوراثية بالنسبة للنباتات العقيمة التى تكثر خضريًا، والنباتات ذات دورات الحياة الطويلة جدًا، لأن التغيرات الوراثية التى تظهر فى هذه المزارع تكون طفيفة، مما يسمح بالاستفادة منها فى تطوير المحصول بصورة تدريجية (Power & Chapman ١٩٨٥). ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Bright وآخرون (١٩٨٣).

وعنـدما دُرس معـدل ظهـور التباينـات الوراثيـة الجديـدة فـى سـلالة الخيـار Borszczagowski الذى صاحب خمس طرق مختلفة لتجديد النمو .. كانت النتائج، كما يلى:

طريقة تجديد النمو	التباينات الوراثية الجديدة (% من السلالات)
micropropagation	صفر
direct leaf callus regeneration	قليلة جدًّا
callus regeneration	٥,٩
recurrent leaf callus regeneration	٤٢,٨
direct protoplast regeneration	٩٠

هذا .. ولم تظهر النباتات الرباعية التضاعف إلاّ عندما كـان تجديـد النمـو بطريقتـى leaf callus regeneration، و recurrent leaf callus regeneration، حيث بلغت نسبة النباتات المتضاعفة ٤,٧، و ٢٨٪، على التوالى (Plader وآخرون ١٩٩٨).

٣ — مزارع الجاميطات:

يطلـق علـى التباينـات التـى تشـاهد بـين النباتـات التـى يتجـدد نموهـا مـن مـزارع الجاميطات اسم تباينات سلالات الجاميطات gametoclonal variation، وذلـك مقارنـة بتباينات السـلالات الجسـمية somaclonal variation الـذى يُتحصـل عليـه مـن مـزارع الأنسجة الجسمية. ويمكن الحصول على تباينات سلالات الجاميطات من زراعة الخلايا الجاميطيـة أو مشـتقاتها. وبخاصـة مـزارع المتـوك والــ microspores (عـن Chawla ٢٠٠٠).

ولمزارع حبوب اللقاح أهمية خاصة فى هـذا الشـأن؛ ويرجـع ذلـك إلى أنهـا أحاديـة المجموعة الكروموسومية، وهو ما يعنى ظهور الطفرات المتنحية بمجـرد حـدوثها، يلـزم فى هذه الحالـة تعـريض حبـوب اللقـاح للعامـل المطفـر، ثـم زراعتهـا لإنتـاج النباتـات الأحادية التى تُقيِّم بدورها لتمييز النباتات الحاملة للطفرات المرغوب فيهـا، وهـى التـى تُضـاعف — بعـد ذلـك — بالكولشيسـين؛ لإكثـارها والمحافظـة عليهـا. وتـزداد أهميـة النباتات الأحادية عند وجود أكثر من طفرة متنحية فـى النبـات الواحـد؛ حيـث تظهـر جميعها فى آن واحد. دونما حاجة إلى إجـراء التلقيح الذاتى، وزراعة أعداد كبيرة مـن

نباتات الجيل الطفرى الثانى؛ للتعرف على النباتات التى تحمل جميع الطفرات المتنحية بحالة أصيلة مثلما يتطلب الأمر فى النباتات الثنائية

ومن المزايا الأخرى لمزارع حبوب اللقاح .. أن الطفرات المتكونة تظهر فى جميع خلايا النبات الأحادى، ولا تكون على صورة كيميرا، كما يحدث فى النباتات الثنائية المجموعة الكروموسومية ويمكن إنتاج الطفرات إما بتعريض المتوك للعوامل المطفرة قبل زراعتها، وإما بإنتاج نباتات أحادية من مزارع متوك غير معاملة، ثم تحضير مزارع خلايا أوبلاوتوبلازم منها، ومعاملتها بالعوامل المطفرة؛ لإحداث الطفرات المقاومة لمركبات كيميائية معينة، أو التى تتحمل ظروفًا بيئية خاصة، ثم إنتاج نباتات كاملة منها

وبالنسبة لأهداف برامج التربية التى اعتمدت على تباينات المزارع .. فهى متنوعة كما يتبين من الأمثلة التالية:

• تعددت محاولات استخدام مختلف أنواع المزارع من قبل مربى النبات لانتخاب سلالات مقاومة للآفات، أو لظروف بيئية معينة، وعلى سبيل المثال تمكن Bourgeais (١٩٨٧) من زيادة القدرة على تحمل الملوحة فى مزارع صنف الطماطم St-Pierre بتكرار زراعتها أربع مرات فى بيئات تحتوى على تركيزات متزايدة من كلوريد الصوديوم، وصلت إلى ١٠٠ مللى مول، واستخدام فى هذه المزارع إما القمة الطرفية للسيقان، وإما كالس حصل عليه من جذور وسيقان النباتات. ويذكر Stavarek & Rains (١٩٨٤) أنه أمكن انتخاب سلالات خلايا Cell Lines مقاومة للملوحة من مزارع الخلايا لعدة محاصيل زراعية، منها الفلفل، والبرتقال، وقصب السكر، والبن، والأرز، والقلقاس، والبرسيم الحجازى، والتبغ وتكمن المشكلة — فى برامج التربية التى من هذا النوع — فى صعوبة الحصول على نباتات كاملة من سلالات الخلايا المنتخبة لمقاومة الملوحة (أو غيرها من العوامل البيئية)؛ ففى البرسيم الحجازى كانت المزرعة التى أجرى فيها الانتخاب قديمة، وحدث فيها تغيرات وراثية فى صفات كثيرة إلى درجة لم تسمح بنمو النباتات التى تميزت منها لاختبار مقاومتها للملوحة وإكثارها، وفى الأرز كانت النباتات المقاومة للملوحة الناتجة من سلالات الخلايا عقيمة بدرجة

عالية، ولكن أمكن الحصول على نباتات من مزارع التبغ كانت قادرة على النمو فى محلول مغذ يحتوى على ٢.٦٢٪ كلوريد صوديوم

• فى مجال التربية لمقاومة التركيزات المرتفعة من عنصر الألومنيوم (حيث يصل العنصر لتركيزات عالية إلى درجة السمية فى الأراضى الحامضية) .. أمكن انتخاب عدة سلالات خلايا Cell Lines من صنف الطماطم مارجلوب Marglobe عند زراعتها فى بيئة مغذية، تحتوى على ألومنيوم فى صورة Al-EDTA بتركيز ٢٠٠ ميكرومول، لكن لم يمكن إنتاج نباتات من هذه المزرعة لأن الكالس كان مسنًّا. وأمكن فى دراسة أخرى انتخاب سلالات خلايا من الجزر مقاومة للتركيزات المرتفعة من الألومنيوم، وهو على صورة كلوريد الألومنيوم، وأمكن إنتاج نباتات كاملة منها وقد لقحت هذه النباتات ذاتيًا، واختبرت بادراتها فى محلول مغذ، يحتوى على تركيز مرتفع من كلوريد الألومنيوم، ووجد أنها كانت على درجة عالية من المقاومة

• أمكن كذلك الاستفادة من مزارع الخلايا فى إنتاج سلالات تبغ مقاومة لفيرس الموزايك وقد تحقق ذلك بعدوى أوراق نبات تبغ أحادى المجموعة الكروموسومية بشكل متجانس تمامًا بإحدى سلالات الفيرس، ثم تعريضها لأشعة جاما. وأخذت بعد ذلك أجزاء من نسيج هذه الأوراق، وزرعت فى بيئة مغذية، تحتوى على تركيز مرتفع من السيتوكينين، وعرضت لإضاءة قوية. سمحت هذه الظروف بحدوث نمو غير متساو للخلايا المحتوية على الفيرس (القابلة للإصابة) والخالية منه (المقاومة التى حدثت بها الطفرات) بحيث أمكن التمييز بين الكالس الأصفر البطئ النمو (المصاب)، والأخضر السريع النمو (المقاوم)، وأمكن من بين ٣٢١٠ calli (جمع كالس) الحصول على سبعة نباتات كانت مقاومة للفيرس، هذا . بينما لم يُحصل على أية نباتات مقاومة للفيرس من الأوراق التى لم تعرض للأشعة. وقد استمرت المقاومة فى نسل هذه النباتات، وظهرت على شكل نقص فى تركيز الفيرس، وضعف حركته فى النبات مما أدى إلى تأخير ظهور الأعراض لمدة ٣–٨ أسابيع، مقارنة بالنباتات غير المقاومة (عن Daub ١٩٨٤)

• استخدمت سموم المسببات المرضية فى انتخاب سلالات خلايا Cell Lines مقاومة

لهذه المسببات وقد جذبت هذه الطريقة الانتباه إليها لسهولتها. ولأن جميع الخلايا تعرض لمستوى واحد من سموم المسببات المرضية، ولكن يعيبها أن نسبة بسيطة فقط من المسببات المرضية هي التي تُنتج سمومًا، وأن قليلاً من هذه السموم هو الذى أمكن عزله وتنقيته، لاستخدامه فى الانتخاب للمقاومة، كما أن بعض السموم تكون خاصة بعوائل معينة hos-specific. وتحدث بها نفس الأعراض التى تحدثها المسببات المرضية ذاتها، بينما تكون سموم أخرى ذات تأثير عام non-host-specific على عدد كبير من الأنواع النباتية. ويكون دورها فى إحداث الأعراض المرضية أقل من سابقتها

ومن أمثلة سلالات الخلايا التى انتخبت لمقاومتها لسموم المسببات المرضية أو راشح بيئاتها Culture Filtrates، والتى تميزت نباتات كاملة منها ما يلى:

أ – المقاومة للبكتيريا *Pseudomonas syringe* فى التبغ

ب – المقاومة لفطرى *Phytopthora infestans*، و *Fusarium oxysporum* فى البطاطس

جـ – المقاومة لفطر *Phoma lingam* فى لفت الزيت *Brassica napus* (عن Daub ١٩٨٤)

د – أمكن كذلك عزل سلالات من الذرة، تحتوى على صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى مع المقاومة لسموم السلالة T من الفطر *Helminthosporium maydis* المسبب لمرض لفحة الأوراق الجنوبية، بواسطة تعريض مزارع أنسجة من سلالات ذرة، تحمل سيتوبلازم تكساس الخاص بالعقم الذكرى، لسموم الفطر. ووجد أن صفة المقاومة هذه تورث عن طريق السيتوبلازم، وأن النباتات المنتخبة كانت مقاومة لدى اختبارها تحت ظروف الحقل وجدير بالذكر، أن جميع أصناف الذرة التى تحتوى على سيتوبلازم تكساس العقيم الذكر Texas Male Sterile Cytaplasm تصاب بهذا الفطر بدرجة أكبر بكثير من الأصناف الأخرى ويبدو أن سم هذا الفطر يؤثر فى الميتوكوندريا (عن Cooking & Riley ١٩٨١). ولمزيد من التفاصيل عن دور مزارع الانسجة فى الانتخاب لمقاومة الأمراض .. يراجع Earle & Gracen (١٩٨١)، و Daub (١٩٨٤)

العوامل المؤثرة فى معدل تباينات المزارع

تتوفر تقارير تفيد حدوث تباينات مزارع بنسب عالية وصلت فى الكرفس إلى ١٠٠٪، وفى خصوبة القمح إلى ٣٪–٢٦٪، كما قدر البعض أن معدل حدوث الطفرات فى الجينات المفردة تبلغ ٤–٥٪. إلاّ أن الكثرة الغالبة من تلك التباينات هى – غالبًا – ناتجة من تكاثر نباتات مزارع أو انقسامات لخلايا ظهرت بها تلك التباينات فى المزارع ذاتها؛ بمعنى أن تلك النسبة العالية من التباينات نشأت عن تكاثر لتباين سابق.

ويمكن القول – بصورة عامة – أن نسبة تباينات المزارع تتراوح – غالبًا – بين ١٪، و ٣٪. ولا يعنى ذلك توقع ظهور طفرة فى أى جين بنسبة ١–٣٪، ولكنه يعنى أن ١–٣٪ من النباتات التى يتجدد نموها فى المزارع سوف تختلف عن النبات الذى أكثرت منه فى بعض الصفات الفيزيائية أو البيوكيميائية (عن Skirvin وآخرين ١٩٩٤).

ويتأثر مدى ظهور تباينات المزارع بالعوامل التالية:

١ – مدى انحراف النمو فى المزارع عن النمو الطبيعى المنتظم:

أصبح من المعروف والمسلم به أنه كلما انحرف النمو عن الصورة الطبيعية التى تتميز فيها الخلايا بشكل طبيعى، وكلما طالت فترة ذلك الانحراف كلما زادت احتمالات ظهور تباينات المزارع. وعلى سبيل المثال .. تُعد مزارع الكالس القديمة ومزارع معلقات الخلايا غير ثابتة وراثيًا، وغالبًا ما تُظهر النباتات التى يتجدد نموها منها أو من البروتوبلاستات التى يتحصل عليها منها قدرًا كبيرًا من تباينات المزارع.

هذا .. ويتباين كثيرًا مستوى التضاعف فى النباتات التى يتجدد نموها من مزارع الكالس، ومزارع معلقات الخلايا، ومزارع البروتوبلاست؛ مما يدل على ضعف التحكم فى تنظيم خطوات الانقسام الميتوزى أثناء تكاثر الخلايا بالمزارع.

٢ – فترة النمو المرزعى (فى البيئة الصناعية):

كثيرًا ما تتراكم التباينات فى المزارع القديمة التى حوفظ عليها لفترة طويلة – كما أسلفنا بيانه – إلى درجة أنه عند الإكثار الدقيق يتعين التوقف عن إعادة زراعة المزارع بعد فترة معينة (بغرض الحد من الـ subculturing)؛ لما قد تتضمنه كثرة إعادة الزراعة من مخاطر ظهور تباينات المزارع. ولذا .. تلجأ شركات الإكثار الدقيق إلى بدء مزارع

جديدة بصورة منتظمة، مع إنهاء المزارع القديمة (عدم تجديدها) لضمان استمرارية إنتاج الشتلات

أما عندما تكون المحافظة على المزارع لأطول فترة ممكنة أمرا ضروريًا – كما في بنوك الجيرمبلازم – فإن المزارع تحفظ في أوعية محكمة الإغلاق في الثلاجة أو في النيتروجين السائل

وعلى الرغم من أهمية المحافظة على الجيرمبلازم من التغير الوراثي، فإن الجيرمبلازم المخزن لفترة طويلة يمكن أن يكون مصدرًا جيدا للتباينات الجديدة

٣ – التركيب الوراثي للنبات الذى يؤخذ منه الجزء المزروع:

يتباين مدى الاستعداد لظهور تباينات المزارع باختلاف التركيب لوراثي للنبات الذى أخذ منه الجزء المزروع، كما أن النباتات المتضاعفة – بما لها من قدرة أكبر على تحمل التغيرات الوراثية فيها – تكون أكثر إنتاجًا للتباينات في المزارع وبينما يكون للطفرات الجينية فرصة أكبر للظهور فى النباتات الأحادية والثنائية فإن فرصتها للبقاء تكون أكبر فى النباتات المتضاعفة، حتى وإن كانت لها تأثيرات ضارة.

وتحديدًا .. فإن معدل ظهور تباينات المزارع يتوقف على العوامل التالية التى تتعلق بالتركيب الوراثى للنبات الذى يؤخذ منه الجزء المزروع:

أ - التركيب الوراثي للصنف المستعمل

يستدل من عديد من الدراسات على أن معدل ظهور تباينات المزارع تتأثر بالتركيب الوراثي للبنات المستعمل، حيث توجد تباينات صنفية داخل النوع النباتي الواحد، وأخرى نوعية داخل الجنس الواحد

ب – عمر الصنف المستعمل:

يبدو أنه لا يوجد ارتباط كبير بين عمر الصنف المستعمل في الزراعة ومعدل ظهور التباينات فيه، على الرغم من توقع ظهور تباينات أكثر فى الأصناف القديمة التى قد تتراكم فيها الطفرات وتأخذ فرصتها للتعبير عن ذاتها فى مزارع الأنسجة

جـ – مستوى التضاعف:

يبدو أن التباينات التى تظهر فى المزارع تكون أعلى فى النباتات المتضاعفة، وفى الأنواع التى تحتوى -- أصلاً -- على عدد كبير من الكروموسومات عما فى النباتات الثنائية العدد الكروموسومى وتلك التى ينخفض عدد الكروموسومات فيها ولعل قصب السكر من الأمثلة التى تؤيد ذلك، وهو نبات يحتوى على عدد كبير من الكروموسومات، وكان أول نبات اكتشفت فيه تباينات المزارع وعند عمل مزارع الكالس أو البروتوبلاست فى البرسيم الحجازى الثنائى العدد الكروموسومى، فإن أول التباينات التى تلاحظ فى مزارع الكالس أو البروتوبلاستات تكون النباتات الرباعيه التضاعف، بينما تكثر فى مزارع البرسيم الحجازى الرباعى العدد الكروموسومى كلا من حالات التضاعف الكروموسومى غير التام aneuploidy والتام autoploidy

ويمكن القول أن مستوى تضاعف النبات المستخدم فى الزراعة يعد أحد أهم العوامل المؤثرة فى هذا الشأن. حيث يزداد ظهور التباينات – على الأقل تلك التى تتضمن حالات عدم الثبات الكروموسومى – بزيادة مستوى التضاعف. وقد يكون مرد ذلك إلى زيادة تحمل النباتات المتضاعفة لحالات عدم التوازن الجينى التى قد تحدث بفعل التغيرات الكبيرة التى تدخل ضمن حالات التضاعف الكروموسومى سواء أكان ذلك بالزيادة، أم بالنقصان أما بالنسبة للطفرات العاملية فإن فرصة ظهورها تكون أكبر فى النباتات الأحادية والثنائية عما فى النباتات المتضاعفة، إلا أن فرصة بقاءها – إن كانت لها تأثيرات ضارة – تزداد فى النباتات المتضاعفة

ويعد الموز (وهو ثلاثى التضاعف) من أكثر الأنواع النباتية تكوينًا للتباينات فى مزارع الأنسجة، ففى أستراليا ذكر أن ٩٠٪ من نباتات الموز التى نتجت من مزارع الأنسجه كانت مخالفة للصنف تحت ظروف الحقل. وكانت معظم تلك التباينات من نوع واحد يطلق عليه اسم choke throat، وهى حالة تمنع سُباطة الموز من البزوغ من خلال الساق الكاذبة للنبات، وتعطى سُباطة شديدة الاندماج ذات أصابع صغيرة الحجم ويعتقد بأن هذا المحصول – الذى لا يحدث فيه تقدمًا يذكر عند محاولة تحسينه بطرق التربية التقليدية – قد يشهد تقدمًا ملموسًا فى تربيته إذا ما أمكن الاستفادة من التباينات الكبيرة التى تظهر فى مزارع الأنسجة

٤ -- محتوى بيئات الزراعة من منظمات النمو

تؤثر منظمات النمو - مثل الـ 2,4-D، و الـ BA – على تباينات المزارع خلال مرحلة النمو فى بيئة الزراعة من خلال تأثيرها على انقسام الخلايا. ودرجة عدم انتظام النمو، والتكاثر السريع لفئة خاصة من الخلايا ولقد وجد – على سبيل المثال – أن منظم النمو 2,4-D يتسبب في ظهور نسبة عالية من التباينات كذلك يسبب غاز الإثيلين عند تركيزات تقل عن ٠٠١ جزء فى المليون بالحجم فى ظهور تغيرات مورفولوجية، وذلك إذا سمح له بالتراكم فى أوعية المزارع.

ومن المعتقد أن معدل ظهور التباينات يزداد بزيادة التركيز العام لمنظمات النمو، كما يمكن أن يؤثر التركيز العالى على معدل التباينات التى تظهر نتيجة للتضاعف الكروموسومى مقابل تلك التى تنشأ كطفرات عاملية

هذا إلاّ الأنواع النباتية تختلف فى مدى استجابتها لمختلف منظمات النمو، كما تختلف كذلك -- فى محتوى الأجزاء النباتية المزروعة منها من منظمات النمو الطبيعية، ولذا يكون من الصعب – غالبًا – تحديد البيئه المثلى لتحفيز ظهور تباينات المزارع

كما وجد أن السيتوكينينات تقلل من مدى التضاعف بالمزارع

٥ المكونات الأخرى لبيئات الزراعة:

وجد – على سبيل المثال أن تغيير مستويات الفوسفات والنيتروجين وصور النيتروجين فى بيئة الزراعة يجعل من الممكن التحكم فى مستوى التضاعف

٦ – ظروف المزارع

تؤدى بعض الظروف التى تتعرض لها المزارع، مثل الحرارة الأعلى عن ٣٥ْم، وطول مدة بقاء المزرعة إلى زيادة معدل ظهور التباينات فى النباتات التى يتجدد نموها منها

٧ – الجزء النباتى المزروع:

تجب عند محاولة الحصول على تباينات مزارع فى صنف أو نوع نباتى جديد محاولة إجراء الزراعة باستعمال explants مختلفة لأنها لا تتماثل – غالبًا – فى معدل

ظهور التباينات فيها. وبصورة عامة .. فإن التباينات تكون أقل ظهورًا عندما تستخدم في الزراعة نموات سابقة التكوين، مثل: البراعم الإبطية، والقمة النامية الخضرية والميرستيمية، مقارنة باستخدام explants لا يوجد بها ميرستيمات سابقة التكوين لنموات خضرية، مثل: الأوراق، والجذور، والبروتوبلاست. وبعبارة أخرى .. فإنه كلما كانت الأنسجة في الجزء النباتي المستعمل في الزراعة أكثر تخصصًا وأكبر عمرًا كلما زادت فيها فرصة ظهور تباينات المزارع؛ ذلك لأن معظم التغيرات الوراثية المسئولة عن تلك التباينات غالبًا ما تصاحب عملية التميز النسيجي في النمو والتطور النباتي الطبيعي.

ونجد في الأقحوان – على سبيل المثال – أن النباتات التي يتجدد نموها من البتلات المزروعة يظهر بها قدرًا أكبر من التباينات الخاصة بلون الزهرة عن تلك التي يتجدد نموها من أعناق الأزهار.

٨ – معدل التكاثر والتزايد في العدد proliferation rate:

تُظهر المزارع التي تزداد فيها أعداد النموات الجديدة بمعدلات عالية تباينات أكثر مما يكون عليه الحال في المزارع التي يكون فيها معدل التكاثر متوسطًا.

٩ – إمكانية الانتخاب للتباينات في البيئة:

يمكن إجراء الانتخاب للتباينات في بعض الصفات المرغوب فيها، مثل: المقاومة للأمراض، وتحمل مبيدات الحشائش، وتحمل الملوحة. ولكي يكون هذا الانتخاب ذا قيمة، فإن الصفات التي يتم الانتخاب لها على المستوى الخلوي يجب أن تعبر عن ذاتها على مستوى النبات الكامل، وهو أمر لا يتحقق في كل الصفات (عن Skirvin وآخرين ١٩٩٤، و Karp ١٩٩٥، و Gosal & Chahal ٢٠٠٢، و Taji وآخرين ٢٠٠٢).

مزايا وعيوب تباينات المزارع

إن من أهم مزايا وعيوب تباينات المزارع، ما يلى (عن Jain ٢٠٠١):

العيوب	المزايا
١ – قد لا تحدث فى الصفات الزراعية الكمية	يمكن أن تحدث في عديد من الصفات الزراعية الهامة
٢ – تحدث كثير من التغيرات فى الاتجاه الموجب أو السالب	تحدث التغيرات بمعدلات عالية
٣ – لا يمكن التنبؤ بطبيعة التغيرات	قد تكون بعض التغيرات جديدة تمامًا، وقد لا يمكن التوصل إليها بطرق التربية التقليدية
٤ – قد لا تكون التباينات ثابتة وراثيًّا	يفيد الانتخاب فى الزارع فى عزل سلالات متحملة للشد البيئى والرضى
٥ – تتطلب السلالات المنتخبة اختبارات حقلية كثيرة	يفيد الانتخاب فى المزارع فى تقصير فترة عزل التباينات المرغوب فيها
٦ – قد لا تكون التباينات ثابتة بسبب مثلمة الدنا DNA methylation، والعناصر المتنقلة transposon elements	يمكن استعمال أعداد هائلة من الخلايا فى عملية الانتخاب فى المزارع

استحداث الطفرات فى مزارع الأنسجة

إن الجمع بين مزارع الأنسجة والمعاملة بالعوامل المطفرة يعد وسيلة فعالة وسريعة لتحسين المحاصيل البستانية الخضرية التكاثر، وهى طريقة اتبعت بالفعل مع كل من نخيل التمر، والموز، والتفاح، والكمثرى، والبطاطس، والبطاطا، واليام، والتيولب، والأقحوان وغيرهم وجدير بالذكر أن استحداث الطفرات يمكن أن يجرى مع أى نوع من مزارع الأنسجة، وإن كان من المفضل استخدامها فى حالات مزارع الإكثار الدقيق، وتكوين الأجنة الجسمية، والبروتوبلاست.

وإنه لمن المفضل أن تستعمل مزارع أنسجة أو مزارع بروتوبلاست على درجة عالية من النشاط والقدرة على تجديد النمو عند الرغبة فى استحداث الطفرات بتلك المزارع فإذا ما استعملت مزارع البروتوبلاست يكون من الأسهل تعريضها للعامل المطفر بعد يومين من عزل البروتوبلاست، حتى يكون قد جدد تكوين جزءًا من الجدر الخلوية؛ ومن ثم لا تحدث به أضرار من جراء كثرة المعاملات.

كذلك يمكن استخدام مزارع الميرستيم الخضرى القمى لهذا الغرض، إلاّ أن النباتات الناتجة تكون — غالبًا — كيميرية، مما يتطلب تقييم عدة أجيال من النسل قبل إمكان الحصول على سلالة طفرية ثابتة (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

وعندما تستحدث الطفرات فى مزارع الأنسجة — وخاصة مزارع النباتات الخضرية التكاثر — بمعاملتها بالعوامل المطفرة — سواء أكانت على صورة أشعة، أم على صورة مركبات كيميائية .. فإنه يلزم فى كلتا الحالتين تحديد الجرعة التى تقتل ٥٠٪ من الخلايا LD_{50} أولاً من خلال تجارب أولية تستخدم فيها عدة جرعات من العامل المطفر، مع معاملة كنترول (شاهد) للمقارنة. وجدير بالذكر أن جرعات الأشعة التى تناسب إنتاج الطفرات فى مزارع الأنسجة تقل غالبًا عن تلك التى تلزم لمعاملة الأجزاء النباتية كالبذور مثلاً وفى معظم الحالات كانت جرعة 20 Gy مناسبة لاستحداث الطفرات فى مزارع الأنسجة، كما فى البطاطس والأقحوان ونخيل التمر على سبيل المثال (عن Ahloowalia ١٩٩٨).

ويبين جدول (٥-١): بعض الأمثلة لطفرات حُصِلَ عليها بالمعاملة بالعوامل المطفرة فى مزارع الأنسجة.

جدول (٥-١): بعض الأمثلة لطفرات حُصّلَ عليها بالمعاملة بالعوامل المطفرة فى مزارع الأنسجة (عن **Taji** وآخرين ٢٠٠٢).

النبات	العامل المطفر	النسيج المستعمل	الشكل المظهرى للطفرة
البطاطس	أشعة جاما	مزارع القمة النامية	عيون سطحية — تغيرات فى شكل وحجم ولون جلد الدرنات
الأقحوان	أشعة جاما	مزارع القمة النامية	تغيرات فى شكل ولون الأزهار وحجم الزهيرات
القرنفل	أشعة جاما	مزارع القمة النامية	تغيرات فى لون وشكل الأزهار وحجم الأوراق
	أشعة إكس	عقل وحيدة العقدة فى المزارع	تغيرات فى لون الأزهار

انتخاب التباينات من مزارع الأنسجة

التوقيت المناسب لإجراء عملية الانتخاب

يعتمد التوقيت المناسب لإجراء عملية الانتخاب للصفات المرغوب فيها — قبل تجديد النمو أم بعده — على القدرة على تقييم أكبر عدد من الأفراد بأعلى كفاءة وبأقل جهد ممكن، علمًا بأن الانتخاب فى المزارع (فى البيئات) يُمكّن الباحث من تقييم آلاف التباينات المحتملة فى طبق بترى واحد. يؤدى الانتخاب بتلك الطريقة إلى محدودية عدد النباتات التى يتجدد نموها، بما يعنى إمكان تركيز الجهد فى المراحل التالية على عدد أقل من الأفراد. ولذا .. فإنه فى الحالات التى يقل فيها كثيرًا عدد النباتات التى يتجدد نموها، فإن تأجيل الانتخاب إلى ما بعد تجديد النمو ربما يزيد من فرص النجاح. ويتوقف الاختيار بين الانتخاب فى المزارع أو فى النباتات المتجدد نموها منها على أمور عدة، فمثلاً قد يؤدى تعريض المزارع لشدٍ انتخابى كبير إلى الفشل التام فى تجديد النمو النباتى منها، بينما يعنى البديل الآخر ضرورة زراعة وتقييم كل ما يتجدد نموه من نباتات. وعمومًا .. فإن الانتخاب فى المزارع يكون هو الأفضل إذا ما أمكن تعريضها للعامل الانتخابى، بينما يفضل تأجيل الانتخاب إلى ما بعد تجديد النمو إن لم يمكن تحقيق هذا العامل الانتخابى فى المزارع (عن Remotti ١٩٩٨)

أسلوب التعريض لعوامل الشدّ التى يجرى على أساسها الانتخاب

يوجد اتجاهان يتعلقان بطريقة انتخاب التباينات فى مزارع الأنسجة، من حيث أسلوب تعريض المزارع لحالات الشدّ التى يجرى على أساسها الانتخاب، أيكون فجائيًّا، أم تدريجيًّا، كما يلى.

١ — طريقة التعريض الفجائى لحالات الشدّ:

تبعًا لتلك الطريقة .. يتعين مراعاة ما يلى:

أ — يحدد المستوى المثبط لعامل الشد الذى يؤدى إلى موت كل الخلايا المزروعة تقريبا، أو يمنعها من النمو

ب — تجهز بيئة زراعة تزود بضعف إلى ثلاثة أضعاف المستوى المثبط لعامل الشدّ الذى سبق تحديده.

جـ – تُزرع الخلايا فى البيئة المجهزة بالمستوى المثبط من عامل الشدّ.

د – ينتظر لفترة كافية لحين نمو التباينات المحتملة للمستوى المرتفع من عامل الشدّ.

هذا . إلا أن ذلك الأسلوب فى انتخاب التباينات المرغوب فيها قد يكون قاسيًا بدرجة شديدة تموت معه كل الخلايا المزروعة حتى المقاومة منها، بسبب نواتج الأيض السامة التى تنتج من الخلايا الميتة الحساسة

٢ – طريقة التعريض التدريجى لحالات الشدّ:

يتم تبعًا لهذه الطريقة تعريض المزرعة لتركيزات متزايدة تدريجيًّا من عامل الشدّ لا تصل إلى المستويات السامة للخلايا الحساسة إلاّ فى المراحل المتأخرة من الاختبار.

هذا . وما أن تنمو إحدى سلالات الخلايا المقاومة للمستويات العالية من عامل الشدّ .. فإن المزرعة يجب أن يُعاد اختبارها للمقاومة للعامل المثبط، وأن تختبر لثبات خاصية المقاومة، وذلك بزراعة السلالة المنتخبة بعيدًا عن العامل المثبط لعدة أجيال قبل إعادة اختبارها للمقاومة. وفى نهاية المطاف يجب تجديد النمو من تلك السلالة والحصول على نباتات مكتملة النمو منها (عن Duncan & Widholm ١٩٨٦)

التطبيقات العملية للاستفادة من تباينات المزارع

إن من أهم ما يميز تباينات المزارع – بالنسبة لتحسين وتربية النبات – أنها يمكن أن تظهر فى مزارع أفضل الأصناف التجارية وسلالات التربية؛ فلا يحتاج الأمر إلى جهد إضافى يذكر فى تطويرها لتصبح أصنافًا جديدة.

هذا . إلاّ أن تباينات المزارع – مثلها كأى طفرات يجدها المربى – قد لا تكون دائمًا مفيدة أو إيجابية، وقد تكون مفيدة ولكنها تكون مصاحبة بتغيرات أخرى ضارة. كما أنها قد لا تكون بالضرورة جديدة تمامًا.

وعلى الرغم من أن بعض الطفرات تكون ثابتة وراثيًا (genetic)، إلاّ أن بعضها الآخر لا يورث non-heritable (أو epigenetic) ويظهر فقط تحت تأثير بيئة الزراعة، كما أن

قسما ثالثًا من تلك التغيرات يكون وراثـى إلاَ أن التباينـات الحادثـة تعـود تـدريجيًا إلى حالتها العادية بعد التلقيح الـذاتى أو الـتهجين، وهـو أمـر يحـدث عنـدما يكـون مـرد التباينات إلى حدوث تغير مؤقت فى التعبير الجينى (عن Karp ١٩٩٥)

وقد كانت بداية اكتشاف تباينات المزارع فـى مـزارع خلايـا قصـب السـكر فـى عـام ١٩٦٩، حيث ظهرت تباينات كـثيرة بـين الخلايـا فـى أعـداد الكروموسـومات، وبـين النباتات المتكونة منها فى مورفولوجى الكروموسـومات وفـى النشـاط الإنزيمـى، وكانـت بعض النباتات الناتجة أكثر إنتاجًـا للخلفـات، وأبطـأ نمـوًا، وأشـد اعتـدالاً فـى نموهـا الرأســى

هذا .. ويستفاد من تباينات المزارع فى جوانب التربية التالية:

١ — زيادة التباين الوراثى فى الصفات الزراعية والبستانية المرغوب فيها:

لقد تم التعرف على عديد من التباينات المرغوب فيها فى عديد مـن الأنـواع النباتيـة الهامة (جدول ٥-٢) وبدلاً من محاولة الحصـول علـى تلـك التباينـات فـى أى تركيـب وراثى، ثم محاولة نقلها — بطرق التربية العادية — إلى صـنف مرغـوب فيـه، فإنـه مـن الأفضل استعمال تلك الأصناف مباشرة فى مزارع الأنسـجة فـى محاولـة للحصـول علـى التباينات المطلوبة فيها مباشرة وعلى سبيل المثال .. أمكن عند تقييم أكثـر مـن ١٠٠٠٠ سلالة خضرية من صنف البطاطس رصت بربانك الحصول على تباينات ثابتة وراثيًا فـى صفات اندماج النمو وطبيعته، وموعد اكتمال النمو، وتجانس النمو الدرنى، ولـون جلـد الدرنة. كما أظهرت أربـع سـلالات مـن ٥٠٠ مقاومـة للفطـر *Alternaria solani* تحـت ظروف الحقـل، وكانـت ٢٠ سـلالة مـن ٨٠٠ مقاومـة للفطـر *Phytophthora infestans* حمل بعضها مقاومة لعدة سلالات من الفطر

٢ — إجراء الانتخاب فى مزارع الأنسجة ذاتها

يمكن إجراء الانتخاب للصفات المرغوب فيها فى المزارع بيسر وسهولة وكفاءة عالية، خاصة عندما يوجد ارتباط عالٍ بين الاستجابة على المستوى الخلـوى ومسـتوى النبـات الكامل النمو

جدول (٥-٢): أمثلة لحالات تباينات مزارع مرغوب فيها ظهرت فى بعض المحاصيل الزراعية (Brar & Jain ١٩٩٨).

المحصول	الصفة	الجيرمبلازم أو الصنف المنتَج
قصب السكر	القاومة لمرض فيجى، والبياض الزغبى	
البطاطس	القاومة للفطر *Fusarium oxysporum*	
	القاومة للفطر *Phytophthora infestans*	
البطاطا	جلد أكثر دكنة	Scarlet
الذرة	القاومة للفطر *Helminthosporium*	
التبغ	القاومة لمبيدات الحشائش	
	القاومة لفيرس Y البطاطس	NC744
القمح	القاومة للفطر *Helminthosporium*	
	تحمل الحرارة والجفاف	
	القاومة لفيرس تقزم الشعير الأصفر	TC5, TC6, TC9
	تحمل الملوحة	
الأرز	محتوى الليسين	
	القاومة للعصفة blast	
	التقزم، والقاومة للرقاد، وزيادة المحصول بنسبة ١٠٪	Hatsuyme
	تحمل الملوحة	
السورجم	تحمل pH التربة المنخفض	
الطماطم	المحتوى المرتفع من المواد الصلبة	DNAP9
	القاومة للسلالة رقم ٢ من الـ *Fusarium*	DNAP17
الكرفس	القاومة للذبول الفيوزارى	UC-T3
الـ Brassica	القاومة لمبيدات الحشائش	
	تحمل الملوحة	
الفلفل	انخفاض أعداد البذور بالثمار	Bell Sweet
بسلة الزهور	انخفاض محتوى الـ neurotoxin	

٣ — الاستفادة من ازدياد معدل حدوث الكسور الكروموسومية وإعادة التحامها، وما يترتب عليها من حالات نقص وإضافة وانتقالات وانقلابات كروموسومية فى المزارع ..

الاستفادة من ذلك فى زيادة فرصة نجاح التلقيحات البعيدة، أو على الأقل نقل الجينات المرغوب فيها من الأنواع البرية البعيدة إلى الأنواع المزروعة؛ نتيجة لاحتمالات زيادة فرصة حالات التبادل الكروموسومى بينهما بعد حدوث تلك التحورات الكروموسومية فيها، وخاصة عند زراعة الأجنة غير المكتملة النمو للتهجينات البعيدة، حيث لا تستطيع كروموسومات النوع المحصولى والنوع الآخر إتمام عملية الانقسام الاختزالى (عن Brar & Jain ١٩٩٨، و Chawla ٢٠٠٠).

هذا ونقدم — فيما يلى — عرضًا تفصيليًا لمختلف أوجه التطبيقات العملية للاستفادة من تباينات المزارع

إنتاج الأصناف الجديدة

لا شك أن إنتاج أصناف جديدة محسنة هو الهدف الأساسى لجميع برامج التربية، ولقد أمكن الحصول على تباينات من المزارع كانت جديدة تمامًا، بحيث أنها شكلت أصنافًا جديدة من المحاصيل التى ظهرت فيها، دونما حاجة إلى إجراء برامج تربية خاصة بتلك الصفات الجديدة التى ظهرت — تلقائيًا — فى مزارع لأصناف محصولية محسنة.

ومن أمثلة الأصناف التجارية التى طورت بتلك الطريقة، ما يلى (عن Skirvin وآخرين ١٩٩٤، و Chahal & Gosal ٢٠٠٢):

النوع النباتى	الأصناف
Hemerocallis	Yellow Tinkerbell
Paulownia tomentosa	Somaclonal Snowstorn
Pelargonium	Velvet Rose
Torenia	UConn White
Citronella java	B-13

ونعرض – فيما يلى – لقائمتين إضافيتين من قوائم الأصناف الجديدة التى طورت من تباينات المزارع.

١ – قائمة Veilleux & Johnson (١٩٩٨):

المحصول	الصنف	الصفات المميزة
الكرفس	MSU-SHK5	المقاومة للفيوزاريم
	UC-TC	المقاومة للفيوزاريم
البطاطس	White Baron	لا تتلون الدرنات باللون البنى بعد تقشيرها، الدرنات بيضاوية الشكل، والعيون سطحية
البطاطا	Scarlet	الجذور حمراء قاتمة اللون من الخارج
البلاكيرى	Everthornless	الثمار أقل حموضة،والنبات عديم الأشواك
Daylily	Yellow Tinkerbell	التقزم، والنورة القصيرة، والعقم الذكرى
الجيرانيم	Velvet Rose	الخصوبة، والأوراق السميكة المسننة والنمو القائم
الـ Toreina	UConn White	الأزهار البيضاء، والنمو المندمج
الأرز	LSBR-5 & LSBR-33	القاومة للرايزكتونيا

٢ – قائمة Jain (٢٠٠١):

المحصول	الصنف	الصفات المميزة
Rubus	Lincoln Logan	
الموز	صنف جديد	المقاومة للذبول الفيوزارى
القمح	He Zu No. 8	المحصول العالى
Lathyrus sativus	P-24	انخفاض الـ neurotoxin فى البذور – المحصول العالى – النضج المبكر
البطاطس	White Baron	عدم التلون البنى
الذرة	Yidan No. 6	لاستعمال الحبوب وكعلف
البلاكبرى	Lincoln Logan	انعدام الأشواك
الكتان	ANDRO	تحمل الملوحة والحرارة
الكرفس	UC-TC	مقاومة الذبول الفيوزارى
	MSU-SHK5	مقاومة الذبول الفيوزارى
	K-26, K-108, K-128	مقاومة كلا من الذبول الفيوزارى، و *Spodoptera exigua*
الطماطم	DNAP-17	مقاومة الذبول الفيوزارى
	DNAP-9	ارتفاع محتوى الثمار من المادة الصلبة

المحصول	الصنف	الصفات المميزة
Brassica juncea	Pusa Jai Kisan	المحصول العالى — القاومة لانتثار البذور
Cymbopogon	CIMPA/Bio-13	٥٠–٦٠٪ زيادة فى الزيت الأساسى العطرى
الفلفل	Bell Sweet	الثمار صفراء اللون
	A-D4	تبكير النضج وارتفاع المحصول
البطاطا	Scarlet	
الأرز	DAMA	مقاومة فطر *Picularia* — جودة الصفات الأكلية
	FR13A	تحمل الغمر بالماء
	LSBR-4, LSBR-33	القاومة للرايركتونيا
	Hasuyume	

ومن بين تباينات المزارع الأخرى التى وجدت طريقها كأصناف تجارية جديدة طفرة طماطم مختلفة فى اللون والمذاق، والقوام، والقدرة على التخزين. كما ظهرت أصناف من الذرة مقاومة لمبيد الحشائش imidazolinone. ولعل سلالة بسلة الزهور *Lathyrus sativus* — التى ظهرت كطفرة فى مزارع الأنسجة — والتى لا يتراكم الـ neurotoxin ببذورها (٠٣٠٪ مقارنة بـ ٠٣٪ فى الأصناف العادية) لعل تلك السلالة تجعل من الممكن زراعة هذا النبات كمحصول بقولى باعتبار قدرته الفائقة على تحمل الظروف لبيئية القاسية (عن Larkin ١٩٩٨)

الحصول على تباينات جديدة يمكن أن تفيد فى برامج التربية

إن أنواع التباينات الجديدة التى تزهر فى مزارع الأنسجة كثيرة جدًا، كما يتبين من المناقشة التالية

أمثلة متنوعة

من الأمثلة على التباينات الجديدة التى تظهر فى مزارع الأنسجة، ما يلى:

المحصول	التباينات
الأرز	عدد الخلفات — حجم النورة — موعد التزهير — طول النبات — موعد تكوين الرؤوس — شكل الورقة — لون الورقة — حالات عقم

المحصول	التباينات
الذرة	المقاومة للجلايفوسيت
القمح	لون الحبة – الطول – عدد الخلفات – بروتين الحبوب
الشعير	محصول الحبوب – شكل الورقة – وزن ١٠٠٠ حبة – طول النبات – مقاومة الرقاد
فول الصويا	طول النبات – مقاومة الرقاد – موعد النضج – المحتوى البروتينى ومحتوى الدهون بالبذور
قصب السكر	المحصول – محتوى السكر – المقاومة للأمراض
الطماطم	لون الفلقات البنفسجى – النمو القزمى – الإزهار المبكر – لون الثمار البرتقالى
الجزر	المحتوى الأعلى من الكاروتين
البطاطس	المحصول – موعد النضج

ونقدم فى جداول (٥–٣)، و (٥–٤)، و(٥–٥) قوائم أخرى تضم مزيدًا من الأمثلة على تباينات المزارع.

عوامل عدم التوافق

بينما لم يمكن أبدًا – وبعد محاولات موسعة – الحصول على آليل جديد من آليلات عدم التوافق (S alleles) فى الجنس *Lycopersicon* بالمعاملة بالعوامل المطفرة .. فإنه أمكن التعرف على عدد من آليلات S الجديدة فى عدد محدود من السلالات الجسمية somaclones التى حُصل عليها من مزارع المتوك فى *L. peruvianum*، وثبت أن تلك الآليلات كانت ثابتة وراثيًا وبسيطة فى وراثتها (عن Larkin ١٩٩٨).

الأحماض الأمينية

أمكن استحداث تباينات وراثية غنية بالأحماض الأمينية الضرورية بمزارع أنسجة مختلف محاصيل الحبوب، وكانت إحدى الوسائل لتحقيق ذلك الهدف هو بتزويد بيئة مزرعة الأنسجة بنظير مماثل analog لكل واحد من الأحماض الأمينية التى يُرغب فى زيادة تركيزها. يوفر النظير ضغطًا انتخابيًا يكفى لعزل سلالات خلايا مقاومة من عشيرة

الخلايا الأصلية. وهى التى تستمر فى البقاء والتكاثر فى المزرعة من خلال الإنتاج الزائد للحامض الأمينى المرغوب المعنى. ونظريًّا فإن النباتات التى يتجدد نموها من سلالة الخلايا المقاومة لنظير الحامض الأمينى يجب أن تحتوى — كذلك — على تركيز مرتفع من ذلك الحامض

جدول (٥-٣) أمثلة لبعض حالات تباينات المزارع التى انتقلت إلى النسل وبقيت ثابتة وراثيًّا (عن Brar & Jain ١٩٩٨)

المحصول	الصفة	وسيلة الانتقال إلى النسل
التبغ	المقاوم للسم methionine sulfoximine	جنسيًّا
	المقاومة للبكتيريا *Pseudomonas syringae*	جنسيًّا
	تحمل مبيدا الحشائش sulfometoron methyl، و chlorsulfuron	جنسيًّا
الذرة	المقاومة للسلالة T من الفطر *Helminthosporium maydis*	أميًّا
الطماطم	المقاومة للفطر *Fusarium oxysporum*	جنسيًّا
	لون الثمار	جنسيًّا
	المقاومة لفيرس موزايك التبغ	جنسيًّا
القمح	الشمع (انخفاض)، والسفا، ولون القنبعة، والبروتين جلايدين gliadin	جنسيًّا
	المقاومة للفطر *Helminthosporium sativum*	جنسيًّا
الأرز	المقاومة للبكتيريا *Xanthomonas oryzae*	جنسيًّا
Brassica	المقاومة للفطر *Phoma lingam*	جنسيًّا
البرسيم الحجازى	المقاومة للفطر *Fusarium oxysporum*	جنسيًّا
قصب السكر	المقاومة لمرض فيجى Fiji disease	خضريًّا
	المقاومة للفطر *Helminthosporium sacchari*	خضريًّا
البطاطس	المقاومة للفطر *Alternaria solani*	خضريًّا
	المقاومة للفطر *Phytophthora infestans*	خضريًّا

جدول (٥-٤): قائمة ببعض التباينات التى وجدت فى مزارع الأنسجة والخلايا لبعض الأنواع النباتية (عن Veilleux & Johnson ١٩٩٨).

النبات	نوع المزرعة	نوع التباين
		نباتات الخضر
الأسبرجس	بروتوبلاست	المقاومة للفيوزاريم
الجزر	الأجنة الجسمية	زيادة فى المحتوى الكاروتنيى
الكرفس	كالس ومعلق خلايا	المقاومة للفيوزاريم
الخيار	الأجنة الجسمية	تضاعف رباعى
	كالس	عقم ذكرى، وطبيعة النمو، ولون لُب الثمرة
البسلة	كالس وأجنة جسمية	صفات بستانية متنوعة
البطاطس	كالس	تباينات فى الـ RFLP banding
	بروتوبلاست	تغيرات مورفولوجية وتحورات فى بروتين الدرنات
	بروتوبلاست	عدم انتظام الانقسام الميوزى، والعقم الذكرى
	كالس	تضاعف
	بروتوبلاست	تغير فى القابلية للإصابة بالعفن الطرى، ونقص المحصول، وتحسن فى الخصائص التصنيعية
	كالس	المقاومة للفطر *Verticillium dahliae*
	كالس	زيادة المقاومة لنطاطات الأوراق
	بروتوبلاست	زيادة التحمل للعفن الطرى
	بروتوبلاست	تضاعف تام وغير تام
	كالس	تغيرات فى مكونات البروتين
الطماطم	تجديد النمو من الأوراق	تقييد حركة الفيرس
	تجديد النمو من الأوراق	تضاعف، وطفرات عاملية
	كالس	المقاومة للبكتيريا *Clavibacter*
		نباتات الفاكهة
التفاح	الأوراق (أقراص ورقية)	القدرة على التجذير والمقاومة للبكتيريا *Erwinia amylovora*
الموز	إكثار دقيق	تباينات مورفولوجية، وتقزم
الفراولة	مزارع الميرستيم والكالس	عدم انتظام الإزهار، وتغيرات فى طبيعة النمو

تابع جدول (٥-٤)

النبات	نوع المزرعة	نوع التباين
البلاكبرى	إكثار دقيق	تباينات فى طبيعة النمو، وقوة النمو، والخصوبة
Citrus sinensis	أجنة جسدية	تحسن فى لون العصير، وتضاعف رباعى، وانعدام الأشواك، والنضج المبكر
العنب	أجنة جسمية	تضاعف رباعى، وتغيرات فى طبيعة النمو، واختلافات فى فترة الحداثة، والمقاومة للأمراض
		النباتات العطرية
النعناع اليابانى	كالس	تباينات فى الصفات البستانية
		الزهور ونباتات الزينة
African violet	براعم عرضية من الأوراق	تباينات مورفولوجية ورقية
	بروتوبلاست	تضاعف رباعى، وتباينات ورقية وفى لون الأزهار
البيجونيا	كالس	تباينات مورفولوجية
البيتونيا	بروتوبلاست	تضاعف
الورد	كالس	تباينات مورفولوجية
Torenia	كالس	المقاومة للعنكبوت الأحمر والدبابة البيضاء
		المحاصيل الحقلية
البرسيم الحجازى	كالس	نقص المحصول، وطول الساق، وعدد العقد
قرن الغزال Birdsfoot trefoil	بروتوبلاست	ضعف الخصوبة، وتضاعف وضعف الصفات المحصولية
العكرش Fescue	كالس ومعلق خلايا	عقم حبوب اللقاح
الذرة	كالس	تباينات فى الصفات المحصولية معظمها رديئة
	كالس	طفرات عاملية
الشوفان oat	كالس	تباينات فى الصفات المحصولية
الأرز	بروتوبلاست	تأخير فى الإزهار، ونقص فى طول ورقة العلم
	كالس	تحسن فى تحمل الجفاف
الجودار rye	كالس	تباينات مورفولوجية، وتضاعف
السورجم sorghum	معلق خلايا	تباينات فى جينوم الميتوكوندريا
فول الصويا	كالس	تباينات مورفولوجية

تابع جدول (٥-٤):

النبات	نوع المزرعة	نوع التباين
	أجنة جسمية	تباينات في عشر صفات كمية، وفي الأيزوزيمات
	تجديد نمو من العقدة الفلقية	عقم ذكرى وأنثوى
بنجر السكر	كالس	تحمل الأشعة فوق البنفسجية
دوار الشمس	مزارع الفلقات	تباينات مورفولوجية، وطفرات عاملية، وتقزم
	كالس	زيادة في تعبير الكيومارين coumarin
القمح	كالس	تباينات في الدنا
	كالس	تباينات في الصفات المحصولية
	أجنة جسمية	ضعف المحصول، وتباينات في الصفات المحصولية
	كالس	تباينات في جينوم الميتوكوندريا
	أجنة جسمية	سفا أطول، ونقص في وزن ١٠٠٠ حبة

جدول (٥-٥): قائمة ببعض الصفات التى أمكن الانتخاب لها فى مزارع الأنسجة (عن Bajaj ١٩٩٠، و Jain ٢٠٠١).

المحصول	الصفات المنتخبة
	المقاومة لمبيدات الحشائش
القمح	atrazine، و difenzoquat، و picloram
التبغ	atrazine، و amitrole، و paraquat، و chlorsulfuron
الكرنبيات	atrazine، و phenmedipham
الذرة	glyphosate
الشعير	glyphosate
بنجر السكر	chlorsulfuron
	المقاومة للأمراض
الطماطم	*Clavibacter michiganense*، و *Fusarium lycopersici* (وحامض الفيوزاريك)، و *phytophthora infestans*، و *Alternaria solani*، و *Alternaria alternata*، و *Pseudomonas syringae*

تابع جدول (٥-٥)

المحصول	الصفات المنتخبة
البطاطس	*Fusarium solani*، *F. oxysporum*، و *Phytophthora infestans*، و *Alternaria solani*، و potato leaf roll virus
الفراولة	*Phytophthora cactarum*، و *Rhizoctonia fragariae*، و *Botrytis cinerea*
الشعير	Fusarium spp
التفاح	*Phytophthora cactorum*
الترتكيل	Fusarium head blight
الذرة	*Helminthosporium maydis*
الأرز	*Xanthomonas oryzae*
القمح	*Helminthasporium saivum*، و *Septoria nodorum*
البرسيم الحجازى	*Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*
قصب السكر	*Helminthosporium sacchari*
الخوخ	*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*، و *Pseudomonas syringae*
المانجو	*Colletotrichum gloeosporioides*، و *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* وحامض الفيوراريك
	تحمل الظروف البيئية القاسية
الأرز، والذرة، والقمح	تحمل الألومنيوم
البرسيم الحجازى، والأرز، والقمح، والبطاطس، والكرنبيات، والتبغ، والطماطم	تحمل الملوحة
الأرز	تحمل الجفاف
القمح	تحمل الصقيع
الذرة، والأرز	تحمل البرودة
بنجر السكر	تحمل الـ UV-B
الكرنبيات	تحمل الزنك والمنجنيز

جدول (٥–٦): أمثلة لبعض التباينات التي ظهرت في نباتات تجدد نموها من المزارع (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

المحصول	التباين
القمح	المحصول العالى
Lathyrus sativus	انخفاض محتوى السُم ODAP
البطاطس	انخفاض التلون البنى بعد التقشير
	المقاومة للفحة
الكتان	تحمل الملوحة والحرارة
الكرفس	مقاومة الذبول
	مقاومة الدودة الخضراء *Spodoptera exigua*
قصب السكر	مقاومة الفطر *Helminthosporium sacchari*
التبغ	مقاومة فيرس موزايك التبغ
الطماطم	مقامة الذبول الفيوزارى
	ارتفاع محتوى المواد الصلبة الذائبة
الفلفل	الثمار الصفراء
	النضج المبكر
الأرز	تحمل الغمر بالماء
	مقاومة لفحة الأغماد

وبهذه الطريقة أمكن في الذرة – على سبيل المثال – تحقيق ما يلي:

١ – باستعمال نظير التربتوفان 5-methyl-DL-tryptophan أمكن انتخاب كالس يحتوى على تربتوفان حر بتركيز يزيد بمقدار ١٣٣–١٦١ مرة عن التركيز الطبيعي.

٢ – وفي الكالس السابق ذاته ازداد – كذلك – تركيز الفينيل آلانين phenylalanine بمقدار ٢٢–٣٠ مرة عن التركيز العادى.

٣ – ازداد تركيز التربتوفان والفينيل آلانين في أوراق النباتات التي تجدد نموها من ذلك الكالس بمقدار ٢٠٠٠، و ٣٢ مرة – على التوالي – عن التركيز في النباتات العادية

ومن النظائر الأخرى التي استعملت النظير S-2-aminoethyl-L-cysteine (بهدف

زيادة تركيز الحامض الأمينى lysine)، والنظير azetidine-2-carboxylic acid (بهدف زيادة تركيز الحامض الأمينى برولين proline). وبينما قاومت التباينات الوراثية التى حصل عليها فى الذرة النظير الأول بنقص امتصاصه، فإن تباينات أخرى قاومت النظير الثانى بزيادة إنتاج البرولين بنحو ٤٠ مرة عن الإنتاج الطبيعى (Giles وآخرون ١٩٩٣)

هذا .. وبينما لا يتواجد الحامض الأمينى الضرورى ليسين lysine بتركيزات عالية فى بروتينات مختلف محاصيل الحبوب، مثل: القمح، والذرة، والشعير، والأرز، والدُخن اللؤلؤى pearl millet، إلاّ أنه أمكن انتخاب سلالات خلايا من مزارع أنسجة تلك الحبوب كانت عالية المحتوى من الليسين، كما أمكن تجديد نمو نباتات كاملة منها احتفظت بالصفة التى تبين أنها كانت سائدة ويتحكم فيها إما جين واحد، وإما زوجان من الجينات فى مختلف محاصيل الحبوب فيما عدا الأرز الذى كانت فيه صفة المحتوى المرتفع من الليسين متنحية (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢)

مركبات الأيض الثانوية

بلغ العدد الكلى لمركبات الأيض الثانوية التى أمكن عزلها من مزارع الأنسجة والخلايا للنباتات الراقية — والتى ذكر عنها أنها "جديدة" ولم يسبق اكتشافها — ٣٢٢ مركبا، وذلك حتى عام ١٩٩٩ (تتوفر تفاصيلها فى Grather & Schneider ٢٠٠١)، وكان هذا العدد يزيد بمقدار ٢٣٠ مركبا عما كان عليه الحال ف عام ١٩٨٩؛ بمعنى حدوث تسارع كبير فى أعداد المركبات الجديدة المكتشفة بمرور الوقت. حدث هذا فى الوقت الذى لم تشمل فيه الدراسات إلاّ نحو ٤٨ عائلة نباتية فقط.

تُعد الغالبية العظمى لمركبات الأيض الثانوية من التربينات terpenoids (أكثر من ٢٠٠٠٠ مركب)، والألكالويدات alkaloids (حوالى ١٠٠٠٠)، والفينولات phenolics (حوالى ٨٠٠٠)، وقد توزعت المركبات الجديدة المكتشفة على تلك المجموعات الكيميائية؛ فكانت ١٠٠ منها من التربينات، و ٧٢ من الألكالويدات، و ١٤٤ من الفينولات؛ بينما كانت الستة مركبات المتبقية من مجموعات أخرى.

وقد توزعت غالبية المركبات الجديدة المكتشفة على عدد محدود من الأنواع النباتية،

فمثلا كان أكثر من ٥٠٪ من الألكالويدات (٣٧ مركب من ٧٢) من عائلة Apocynaceae وكانت كلها إندولية

وتحظى المركبات المضادة للإصابات السرطانية المتحصل عليها من *Catharanthus roseus* – مثل الـ vincristine والـ vinblastine – باهتمام كبير من الباحثين، حيث دُرست الأنواع الأخرى من نفس الجنس واستخدمت مزارع الخلايا في عزل ١٢ مركبًا من الألكالويدات الإندولية وغيرها من المركبات المضادة للسرطان (عن Grather & Schneider ٢٠٠١)

الحصول على مصادر جديدة لمقاومة الأمراض

عند الانتخب في المزارع ذاتها لمقاومة الأمراض فإنه قد يمكن استخدام ی من الوسائل التالية في عملية التقييم

١ – المسبب المرضى ذاته

يجب أن يؤخذ في الاعتبار عند استخدام المسبب المرضى ذاته في عملية التقييم صعوبة التخلص منه في النباتات التي يتجدد نموها من المزرعة، إلا في حالات المناعة التامة للمسبب المرضى وقد اتبعت هذه الطريقة في حالات قليلة تضمنت حالات مقاومة لفطريات وأخرى لفيروسات

ويتعين عند إجراء ذلك الاختبار مراعاة التجانس التام في عملية الحقن بالمسبب المرضى

٢ راشح مزارع المسبب المرضى

يحتوى راشح مزارع المسبب المرضى على "كوكتيل" من المركبات التي تضم – إلى جانب سُم الفطر المسئول عن الأعراض التي تُحدثها الإصابة بالفطر – على نواتج أيضية أخرى عديدة للفطر، وأخرى من مكونات البيئة ذاتها وغنى عن البيان أن بعضا من تلك المركبات التي تختلط بسُمّ الفطر قد تكون سامة – هي الأخرى – للمزرعة التي يجرى تقييم خلاياها، الأمر الذى قد يؤدى إلى قتل تباينات كانت مقاومة أصلا لسُمّ الفطر

٣ – سُم الفطر المنقى جزئيًا:

يكون سُم الفطر المنقى جزئيًا أفضل في الاستعمال كعامل انتخابي عن راشح مزرعة المسبب المرضي، حيث يتم تجنب بعض المشاكل التي يسببها استخدام راشح المزرعة.

٤ – التحضير النقي لسُمّ المسبب المرضي:

يفضل دائمًا استخدام التحضير النقي لسُمّ المسبب المرضي في عملية الانتخاب في المزارع، وتعرف العديد من تلك السموم لعديد من الفطريات والبكتيريا (عن Remotti ١٩٩٨).

وبالنسبة للانتخاب لمقاومة الفيروسات .. أمكن الحصول على سلالة خلايا تبغ مقاومة لفيرس موزايك التبغ بزراعة خلايا مصابة بالفيرس في بيئة صناعية، حيث أمكن عزل السلالة المقاومة والتي كانت تتميز بمعدل نموها العالي على الرغم من محتواها العالي من الفيرس. وقد أمكن تجديد نمو نباتات تبغ من ذلك الكالس كانت مقاومة للفيرس، وتبين أن صفة المقاومة كانت بسيطة وسائدة (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

ولقد أمكن – عن طريق الانتخاب في تباينات المزارع – الحصول على مصادر كثيرة جديدة لمقاومة الأمراض في عديد من الأنواع المحصولية، نذكر أمثلة عليها في الجداول أرقام (٥–٧) إلى (٥–١٣)، لكن تجدر الإشارة إلى أن ظهور تلك التباينات لا يقتصر على مزارع الأنسجة فقط، إذ إنها تظهر بصورة طبيعية – كذلك – في النباتات الكاملة، حيث يمكن انتخابها كسلالات خضرية جسمية somaclones مقاومة للأمراض (جدول ٥–١٤)

جدول (٥–٧): أمثلة لحالات مقاومة للأمراض انتخبت فى المزارع (عن Remotti ١٩٨٩).

النبات	المسبب المرضى	العامل الانتخابى
الدُخن اللؤلؤى	*Claviceps fusiformis*	راشح مزرعة الفطر
البن	*Colletotrichum kahawae*	سُمٌ منقى جزئيًا
الشعير	*Drechslera teres*	سُمٌ منقى جزئيًا
الباذنجان	ميكوبلازما	المسبب المرضى ذاته
الحور	*Melampsora larici*	راشح مزرعة الفطر
الموز	*Mycosphaerella fijiensis*	راشح مزرعة الفطر، وكـذلك سُـمٌ منقى جزئيًا
التفاح	*Phytophthora cactorum*	راشح مزرعة الفطر
الفراولة	*P. cactorum*	راشح مزرعة الفطر
البطاطس	*P. infestans*	سُمٌ منقى جزئيًا، وراشح مزرعـة الفطر
التبغ	*P. parasitica* var. *nicotianae*	راشح مزرعة الفطر
الليمون الأضاليا	*P. tracheiphila*	سُمٌ منقى جزئيًا
Brassica	*Phoma lingam*	راشح مزرعة الفطر، مع الانتخاب فى النباتات التى يتجدد نموها
الفراولة	*Rhizoctonia fragariae*	الإنزيمات البكتينية
الكرفس	*Septoria apiicola*	راشح مزرعة الفطر
فول الصويا	*S. glycines*	راشح مزرعة الفطر
التبغ	فيرس موزايك التبغ	الفيرس ذاته
الطماطم	فيرس موزايك التبغ	الفيرس ذاته
البرسيم الحجازى	*Verticillium albo-atrum*	راشح مزرعة الفطر
حشيشة الدينار	*V. albo-atrum*	راشح مزرعة الفطر
الباذنجان	*V. dahliae*	راشح مزرعة الفطر
الخوخ	*Xanthomonas campestris* pv. pruni	راشح مزرعة البكتيريا

جدول (٥–٨): أمثلة لحالات مقاومة لكل من الـ *Alternaria*، و الـ *Helminthosporium*، والـ *Pseudomonas* حُصل عليها من خلال مزارع الأنسجة (عن Remotti ١٩٩٨)

النبات	المسبب	العامل الانتخابى
التبغ	*A. alternata* pv *tabaci*	سُمّ الفطر (Al-toxin)
Brassica	*A. brassicicola*	سُمّ منقى جزئيًا مع الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
الجزر	*A. dauci*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
البطاطس	*A solani*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
الطماطم	*A solani*	راشح مزرعة الفطر
الذرة	*H. maydis*	سُمّ الفطر (Hm-toxin) مع الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
الأرز	*H oryzae*	سُمّ الفطر (Ho-toxin) مع الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
قصب السكر	*H sacchari*	سُمّ الفطر (HS-toxin) مع الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
القمح	*H sativum*	سُمّ منقى جزئيًا
الشعير	*H sativum*	سُمّ منقى جزئيًا
الشوفان	*H. victorae*	سُمّ الفطر (HV-toxin)
الكرفس	*P. chichorii*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
الأرز	*P fuscovaginae*	سُمّ البكتيريا (Syringotoxin)
الطماطم	*P solanacearum*	راشح مزرعة الفطر، مع الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
التبغ	*P syringae* pv *tabaci*	سُمّ منقى جزئيًا
	P solanacearum	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
الفاصوليا	*P syringae* pv phaseolicola	سُمّ البكتيريا (Phaseolotoxin)
القمح	*P syringae* pv syringae	سُم البكتيريا (Syringomycin)
الخوخ	*P syringae* pv *syringae*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها

جدول (٥–٩): أمثلة لحالات الانتخاب فى المزارع لمقاومة الفيوزاريم *Fusarium* spp. (عن Remotti ١٩٩٨).

النبات	المسبب المرضى والسلالة	العامل الانتخابى
القمح	*F. culmorum* and *F. graminearum*	السموم، والـ dedeoxynivalenol
الكرفس	*F. oxysporum* f. sp. *apii*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
	F. oxysporum f. sp. *apii* R2	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
الأسبرجس	*F. oxysporum* f. sp. *asparagi*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
	F. proliferatum	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
البطاطا	*F. oxysporum* f. sp. *batatas*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
الخيار	*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*	راشح مزرعة الفطر
الموز	*F. oxysporum* f. sp. *cubense* R4	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
	F. oxysporum f. sp. *cubense* R1	حامض الفيوزاريك
الجلاديولس	*F. oxysporum* f. sp. *gladioli*	حامض الفيوزاريك
الفراولة	*F. oxysporum* f. sp. *fragariae*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
الطماطم	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* R1	راشح مزرعة الفطر
	F. oxysporum f. sp. *lycopersici* R2	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
	F. oxysporum f. sp. *lycopersici* R3	حامض الفيوزاريك مع الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
	F. oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
البرسيم الحجازى	*F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*	راشح مزرعة الفطر
	F. oxysporum, *F. avenacearum* and *F. solani*	راشح مزرعة الفطر، مع الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
	F. oxysporum f. sp. *medicaginis*	الانتخاب فى النباتات التى تجدد نموها
التبغ	*F. oxysporum* f. sp. *nicotianae*	راشح مزرعة الفطر
البطاطس	*F. oxysporum* f. sp. *solani*	راشح مزرعة الفطر
الشعير	*Fusarium* spp.	حامض الفيوزاريك
فول الصويا	*F. solani*	راشح مزرعة الفطر

جدول (٥-١٠): أمثلة لحالات تباينات مزارع مقاومة للأمراض أمكن التعرف عليها بعد تجديد النمو النباتى من تلك المزارع (عن Remotti ١٩٩٨).

النبات	المسبب المرضى والسلالة
الخس	*Bremia lactucae*
الكرفس	*Cercospora apii*
الحور	*Melampsora medusae*
البطاطس	*Phytophthora infestans*
قصب السكر	*Puccinia melanocephala*
القمح	*P. recondita*
الشعير	*Rhynchosporium secalis*
الكرفس	*Septoria apiicola*
الحور	*S. musiva*
الطرطوفة	*Scelerotinia sclerotiorum*
الدُخن اللؤلؤى	*Sclerospora graminicola*
قصب السكر	*S. sacchari*
البطاطس	*Streptomyces scabies*
قصب السكر	*Ustilago scitaminea*
البرسيم الحجازى	*Verticillium albo-atrum*
البطاطس	*V. dahliae*
قصب السكر	فيرس فيجى
البطاطس	فيرس واى البطاطس، وفيرس التفاف أوراق البطاطس، وفيرس إكس البطاطس
الطماطم	فيرس موزايك التبغ
الخس	فيرس موزايك الخس
الطماطم	*Clavibacter michiganemse*
التفاح	*Erwinia amylovora*
الخوخ	*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*
الجيرانيم	*Xanthomanas campestris* pv. *pelargonii*
الأرز	*X. oryzae*

جدول (٥-١١): قائمة بأنواع محصولية مقاومة للأمراض حُصل عليها بالانتخاب فى مزارع الأنسجة (Chawla ٢٠٠٠).

النبات	المسبب المرضى	وسيلة الانتخاب
زيت اللفت	*Phoua lingam, Alternaria brassicicola*	راشح المزرعة
الأرز	*Helminthosporium oryzae*	السُم ذاته
	Xanthomonas oryzae	الخلايا البكتيرية
الشعير	*Helminthosporium sativum*	السُم ذاته
	Fusarium spp.	حامض الفيوزاريك
الذرة	*Helminthosporium maydis*	السُم Hm
الشوفان	*Helminthosporium victoriae*	الفيكتورين
القمح	*Helminthosporium sativum, Fusarium graminearum*	السُم ذاته
	Pseudomonas syringae	Syringomycin
قصب السكر	*Helminthosporium sacchari*	السُم
التبغ	*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*	Methionine sulfoximine
	Alternaria alternata; P. syringae pv. *tabaci*	السُم
	Tobacco mosaic virus	الفيرس
	Fusarium oxysporum f. sp. *nicotianae*	راشح المزرعة
البطاطس	*Phytophthora infestans, Fusarium oxysporum*	راشح المزرعة
	Erwinia carotovora	البكتيريا
البرسيم الحجازى	*F. oxysporum* f. sp. *medicagnis*	راشح المزرعة
الطماطم	Tobacco mosaic virus	الفيرس
	Pseudomonas solanacearum	راشح المزرعة
الباذنجان	*Verticillium dahliae*	راشح المزرعة
	Little leaf disease	الكائن المرض
الخوخ	*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*	راشح المزرعة
الأفيون	*Verticillium albo-atrum*	راشح المزرعة
الكرفس	*Septoria apiicola*	راشح المزرعة

جدول (٥-١٢): قائمة جزئية ببعض النباتات الاقتصادية الهامة التي تم فيها انتخاب سلالات خلايا مقاومة لبعض الأمراض (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢)

النبات	المسبب المرضى	السُم المستخدم في الانتخاب
البرسيم الحجازى	*Colletotrichum* sp	راشح المزرعة الفطرية
الموز	*Fusarium* sp.	حامض الفيوزاريك
البن	*Colletotrichum* sp.	راشح المزرعة الفطرية بعد تنقيته جزئيًا
الذرة	*Helminthosporium maydis*	T-toxin
الشوفان	*Helminthosporium victoriae*	Victorin
لفت الزيت	*Phoma lingam*	راشح المزرعة الفطرية
الخوخ	*Xanthomonas* sp	راشح المزرعة البكتيرية
البطاطس	*Phytophthora infestans*	راشح المزرعة الفطرية
الأرز	*Xanthomonas oryzae*	راشح المزرعة البكتيرية
قصب السكر	*Helminthosporium* sp.	راشح المزرعة الفطرية
	Helminthosporium sachari	HS toxin منقى جزئيًا
التبغ	*Pseudomonas tabaci*	Methionine sulfoximine
	Alternaria alternata	السم الفطرى بعد تنقيته جزئيًا

جدول (٥-١٣): أمثلة لحالات انتخاب لمقاومة أمراض في مزارع الأنسجة (عن Jayasankar & Gray ٢٠٠٥)

المحصول		المسبب المرضى	وسيلة الانتخاب
البرسيم الحجازى	Alfalfa *Medicago sativa*	*Colletotrichum gloeosporioides*	راشح المزرعة
الأسبرجس	Asparagus *Asparagus officinalis* L	*Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*	المسبب المرضى ذاته
الشعير	Barley	*Helminthosporium sativum*	راشح مزارع منقى جزئيًا
	Avena sativa L		
الكرنب الصينى	Chinese cabbage *Brassica campestris* spp. *pekinensis*	*Erwinia carotovora*	راشح المزرعة + التعريض للأشعة فوق البنفسجية

تابع جدول (٥-١٣):

المحصول		المسبب المرضى	وسيلة الانتخاب
البن	Coffee *Coffea arabica* L.	*Colletotrichum kahawae*	راشح مزارع منقى جزئيًا
الباذنجان	Eggplant *Solanum melangena* L.	*Verticillium dahliae*	راشح المزرعة
العنب	*Grapevine* *Vitis vinifera* L.	*Elsinoe ampelina*	راشح المزرعة
		Colletotrichum gloeosporioides	راشح المزرعة
الذرة	Maize *Zea mays*	*Helminthosporium maydis*	السّم T (أو T-toxin)
المانجو	Mango *Mangifera indica*	*Colletotrichum gloeosporioides*	الفطر + راشح المزرعة
الخوخ	Peach *Prunus persica* L.	*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*	راشح المزرعة
البطاطس	Potato *Solanum tuberosum*	*Phytophthora infestans*	راشح المزرعة
الأرز	Rice *Oryza sativa*	*Xanthomonas oryzae*	راشح المزرعة
الفراولة	*Strawberry* *Fragaria* sp.	*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*	حامض الفيوزاريك
قصب السكر	Sugarcane *Saccharum officinarum* L.	*Helminthosporium sacchari*	راشح المزرعة
التبغ	Tobacco *Nicotiana tabaccum*	*Pseudomonas tabaci*	Methionine sulfoximine
الطماطم	Tomato *Lycopersicon esculentum* Mill	*Fusarium oxysporum*	حامض الفيوزاريك

جدول (٥–١٤): قائمة بمحاصيل زراعية مقاومة للأمراض حُصل عليها بانتخاب سلالات خضرية جسمية عند مستوى النباتات الكاملة النمو، وليس فى مزارع الأنسجة (عن Chawla ٢٠٠٠)

المحصول	المسبب المرضى
محاصيل حقلية	
الشعير	*Rhynchosporium secalis*
الذرة	*Helminthosporium maydis*
الأرز	*Helminthosporium oryzae*
لفت الزيت	*Phoma lingam*, *Alternaria brassicicola*
قصب السكر	Fiji virus, *Sclerospora sacchari*, *Helminthosporium sacchari*, *Puccinia melanocephala*
محاصيل بستانية ومحاصيل أخرى	
البطاطس	*Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, Potato virus X & Y, *Streptomyces scabie*, *Verticillium dahlie*
التبغ	*Phytophthora parasitica*
الطماطم	*Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas solanacearum*
البرسيم الحجازى	*Verticillium albo-atrum*, *Fusarium solani*
الكرفس	*F. oxysporum* f. sp. *apii*, *Septoria apii*
الخس	Lettuce mosaic virus
التفاح	*Phytophthora cactorum*
الموز	*F. oxysporum* f. sp. *cubense*
الخوخ	*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, *pseudomonas syringae* pv. *syringae*
الحور	*Septoria musiva*, *Melamspora medusae*

الحصول على مصادر جديدة لمقاومة الآفات

تتوفر – كذلك – أمثلة لحالات أمكن فيها الانتخاب لبعض الآفات الزراعية كالحشرات والنيماتودا فى مزارع الأنسجة، منها ما يلى:

١ – انتخاب كالس قمح مقاوم لنوع المن *Diuraphis noxia* بإضافة مستخلص الحشرة إلى مزرعة الكالس، وكانت النباتات التى تجدد نموها من ذلك الكالس ونسلها أكثر مقاومة عن الصنف الأصلى.

٢ -- أمكن انتخاب سلالات مزارع كالس من الدُخن (السورجم) كانت مقاومة للـ fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*)، دون أية إضافات للمزرعة؛ علمًا بأنه لم يكن يعرف عن السورجم مقاومة لتلك الحشرة من قبل.

٣ – انتخبت سلالات من الخوخ ذات مستوى عالٍ من المقاومة لنيماتودا تعقد الجذور *Meloidogyne incognita* (عن Remotti ١٩٩٨، و Taji وآخرين ٢٠٠٢)

الحصول على تباينات تتحمل الظروف البيئية القاسية

تفيد تباينات مزارع الأنسجة – كثيرًا – فى الحصول على مصادر لتحمل الظروف البيئية القاسية المختلفة؛ حيث يمكن الانتخاب لبعض عوامل الشد البيئى – مثل الملوحة، والجفاف، والحرارة العالية، والحرارة المنخفضة ... إلخ – فى مزارع الأنسجة بيسر وسهولة.

أمثلة متنوعة

نقدم فى جدول (٥–١٥) أمثلة على بعض حالات تحمل الشدّ البيئى التى أمكن الانتخاب لها فى مزارع الأنسجة.

جدول (٥–١٥): أمثلة لحالات انتخاب فى مزارع الأنسجة لبعض ظروف الشدّ البيئى (عن Remotii ١٩٩٨).

النوع	طبيعة التحمل الذى تحقق من خلال مزارع الأنسجة
Sorghum bicolor	تحمل الأرض الحامضية
Daucus carota	تحمل الألومنيوم
Nicotiana plumbaginifolia	تحمل الألومنيوم
Oryza sativa	تحمل الألومنيوم
Solanum tuberosum	تحمل الألومنيوم
Datura innoxia	تحمل الكادميوم
Nicotiana tabacum	تحمل الكادميوم
Oryza sativa	تحمل الكادميوم
	تحمل الشدّ الرطوبى
Triticum durum	تحمل الشدّ الرطوبى
Triticum aesativum	تحمل الشدّ الرطوبى، وتحمل الحرارة العالية
Gossypium hirsutum	تحمل الحرارة العالية (٣٨م)
Cucumis melo	القدرة على الإنبات فى الحرارة المنخفضة (١٤م)

تابع جدول (٥–١٥).

النوع	طبيعة التحمل الذى تحقق من خلال مزارع الأنسجة
Linum usitatissimum	القدرة على الإنبات فى الحرارة المنخفضة (٥–٨°م)
Medicago sativa	تحمل التجمد (–١٦°م)
Oryza sativa	تحمل البرودة (٥–١٠°م)
Trifolium pretense	تحمل التجمد (–١٠°م)
T. aestivum	تحمل التجمد (–١٣°م)
Zea mays	تحمل البرودة (٤°م)
Beta vulgaris	تحمل الأشعة فوق البنفسجية UV B

الأساس الفسيولوجى لتحمل الظروف البيئية القاسية

يبدو أن الأساس الفسيولوجى لتحمل بعض الظروف البيئية القاسية يخضع لتحكم بعض الجينات المنظمة الرئيسية؛ نظرا لأن بعض سلالات الخلايا المقاومة المعزولة تظهر مقاومة لعديد من الظروف. فمثلا: نجد أن السلالات المقاومة للملوحة غالبا ما تكون مقاومة للجفاف. كذلك فإن سلالة خلايا من قصب سكر مقاومة لتثبيط لنمو الذى يحدثه الـ hydroxyproline أظهرت تحملاً عاليًا للبوليثيلين جليكول (الذى يرفع الضغط الأسموزى لبيئة الزراعة)، والحرارة المنخفضة (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢). كذلك وُصفت سلالة من القمح انتخبت من مزرعة كالس عوملت بحامض الأبسيسك بأنها ذات قدرة عالية على تحمل ظروف الشدّ البيئى. وقد كانت تلك السلالة غير حساسة لمستويات حامض الأبسيسك المنتج بواسطة النبات، سواء أكان ذلك فى مرحلة البادرة، أم النبات البالغ (عن Remotti ١٩٩٨).

هذا.. وتتراكم الـ Quaternary Ammonium Compounds (اختصارا QAC) — مثل الـ glycine betaine فى بعض الأنواع البكتيرية، والنباتات المحبة للملوحة. وفى عديد من النباتات العادية (خاصة من العائلتين الرمرامية والنجيلية) استجابة لأى من الشدّ الملحى أو الجفافى، ويزداد تراكمها فى الأنواع البرية المتحملة للملوحة، مثل *Medicago marina*، إلاّ أن تلك العلاقة لا تظهر بوضوح فى جميع الحالات.

وأدت معاملة مزارع الأنسجة بحامض الأبسيسك إلى عزل سلالات من الخلايا مقاومة

للحامض من كل من القمح و *Nicotiana sylvestris*، وكانت تلك السلالات مقاومة لكل من الحرارة العالية والجفاف فى القمح ولكن ليس فى *N. sylvestris*.

وتلعب الأمينات المتعددة polyamines — كذلك — دورًا فى تحمل النباتات لمختلف ظروف الشدّ البيئى، مثل البوتاسيوم، والشدّ الملحى، والحرارة العالية. ومن أمثلة تلك الأمينات المتعددة ما يلى:

spermine spermidine putrescine

ويبدو أن تلك المركبات تلعب دورًا فى الحماية من الشدّ الملحى بحفظ التوازن الكاتيونى — الأنيونى، وبالمحافظة على الأغشية الخلوية فى حالات التركيزات العالية من الملوحة فى الوسط الخارجى (عن Gulati & Jaiwal ١٩٩٣).

تحمل الملوحة

استخدمت تقنيات مزارع الأنسجة بنجاح فى الحصول على سلالات خلايا متحملة للملوحة فى عديد من الأنواع النباتية، مثل التبغ، والبرسيم الحجازى، والأرز، والذرة، والسورجم. وقد أدى اكتساب صفة القدرة على تحمل الملوحة فى سلالات الخلايا — فى كثير من الأحيان — إلى فقد تلك الخلايا لقدرتها على تجديد النمو، كما لم تكن النباتات — التى أمكن الحصول عليها أحيانًا — من سلالات الخلايا المتحملة للملوحة العالية .. لم تكن تلك النباتات متحملة للملوحة، ولم يحصل على تلك الصفة فى نباتات كاملة مع توريثها للنسل إلا فى حالات قليلة.

أمثلة على حالات تحمل الملوحة

نقدم فى جدول (٥-١٦) بعض الأمثلة على حالات تحمل الملوحة التى ظهرت كتباينات فى مزارع الأنسجة.

جدول (٥-١٦) أمثلة لحالات انتخاب لسلالات خلايا كانت قادرة على تحمل الملوحة فى مزارع الأنسجة، وأمكن تجديد نموها وظهرت الصفة فى النباتات الكاملة وانتقلت إلى أنسالها (عن Chawla ٢٠٠٠)

النوع المحصولى	الجزء النباتى المستخدم فى مزارع الأنسجة	الملح المستخدم والتركيز (جم/لتر)
الأرز	الكالس الجنينى	كلوريد الصوديوم (١٠، ٢٠)
	البذور المكتملة التكوين	كلوريد الصوديوم (١٥)
القمح	الجنين غير المكتمل التكوين	كلوريد الصوديوم (٢-٧)
	الجنين المكتمل التكوين	كلوريد الصوديوم (٥)
لفت الزيت	الفلقات	كلوريد الصوديوم (٧,٥-١٠)
	الأجنة الجسمية	كلوريد الصوديوم (حتى ١٢.٥)
	الأجنة الناتجة من الـ microspores	كلوريد الصوديوم (٦-٧)
Vigna radiata	الفلقات من بادرات المزارع	كلوريد الصوديوم (حتى ١٥٠ مللى مولار)
البرسيم الحجازى	الكالس الناتج من الأجنة غير المكتملة التكوين	كلوريد الصوديوم (١٠)
التبغ	البروتوبلاست الأحادى	كلوريد الصوديوم (١١.٧)
الكتان	الكالس	ملح كبريتات (٢٦.٨)

ومن بين الحالات الأخرى التى انتخبت فيها تباينات مزارع متحملة للملوحة، ما يلى (عن Remotti ١٩٩٨):

النوع النباتى	معاملة الانتخاب
Beta vulgaris	٧,٦ جم/لتر أملاح
Brassica juncea	٥-٢٠ جم/لتر كلوريد صوديوم
Citrus sinensis	٢,٩٢ جم/لتر كلوريد صوديوم
Coleus blumei	٥,٢٥ جم/لتر كلوريد صوديوم
Colocasia esculenta	أملاح مختلفة
Hordeum vulgare	١٠ جم/لتر كلوريد صوديوم
Linum usitatissimum	٢,٥-٣٪ أملاح
Medicago sativa	١٠ جم/لتر كلوريد صوديوم
Nicotiana tabacum	٨,٨-٣٣.٤ جم/لتر كلوريد صوديوم

النوع النباتى	معاملة الانتخاب
Oryza sativa	١٠–٢٠ جم/لتر كلوريد صوديوم
Poncirus trifoliata	٥–١٠ جم/لتر كلوريد صوديوم
Sorgum bicolor	٥ جم/لتر كلوريد صوديوم

كذلك عزلت سلالات خلايا ذات قدرة أكبر على تحمل الملوحة من عديد من الأنواع النباتية (جدول ٥–١٧)، كما تبين ثبات صفة التحمل أثناء الانقسام الميتوزى فى عديد من الدراسات، والتى أمكن فى بعضها تجديد النمو بتكوين الأجنة أو النباتات ويجب أن نتذكر أن الافتراض الرئيسى فى هذه النوعية من الدراسات هو أن الأساس الفسيولوجى لصفة تحمل الملوحة يتشابه – جزئيًا على الأقل – على مستوى الخلوى مع نظيره فى النباتات الكاملة النمو.

إن أهم الاستنتاجات التى يمكن استخلاصها من جدول (٥-١٧) ما يلى:

١ – أظهر الانتخاب لتحمل الملوحة فى مزارع الخلايا (الكالس والمعلقات) فاعلية كبيرة فى كل من النباتات وحيدة الفلقة وذوات الفلقتين، والحولية والمعمرة، التى تنتمى لعائلات كثيرة متنوعة.

٢ – أضيف الملح فى معظم الحالات إلى نسيج كالس أو إلى معلقات خلايا سبق تحضيرها

٣ – اعتمد نجاح انتخاب سلالات خلايا متحملة للملوحة – غالبا – على التباينات التى تحدث طبيعيًا، ولم يكن تأثير استعمال العوامل المطفرة فى المزارع بذى أهمية كبيرة. هذا ويذكر بعض الباحثين أن كلوريد الصوديوم – فى حد ذاته – قد يحفز تكوين تباينات المزارع.

٤ – وجدت علاقة إيجابية بين زيادة إنتاج البرولين والقدرة على تحمل الملوحة فى بعض الأنواع

٥ – تفيد أقلمة المزارع على الضغط الأسموزى المرتفع باستعمال البوليثيلين جليكول أو الملى بيوز milibiose– قبل تعريضها لتركيزات عالية من الأملاح – يفيد ذلك فى زيادة فرصة عزل سلالات خلايا متحملة للملوحة

جدول (٥–١٧) تباينات المزارع المتحملة للملوحة، وظروف الزراعة، وتجديد النمو، وانتقال الصفة للنسل جنسيًا (عن Tal ١٩٩٠)

مسلسل	النوع	المزرعة[أ]	الملح أو الأملاح والتركيز (mM)[ب]	التعرض للملح OS: دفعة واحدة G: تدريجي	الثبات في بيئة خالية من الملح T: عدد النقلات G: عدد الأجيال	تجديد النمو (R_0)[جـ]	تحمل الـ R_0	الانتقال الجنسي
١	*Avena sativa*	كالس	١٧٠	G		+ (نباتات)		
٢	*Brassica napus*	كالس	(Na_2SO_4)١٧٦	OS، و G		+(جذور)		
٣	*B. napus*	كالس	(Na_2SO_4)١٤٠		(T ١٣)+			
٤	*Capsicum annuum*	كالس ومعلق	١٧١، و ٣٤٢	OS	(T ٣)+			
٥	*Pisum sativum*	كالس ومعلق	(M)٤٢٧	G، و OS		+(جذور)		
٦	*Cicer arietinum*	كالس	(H)١٠٠	OS	(T ٣)+			
٧	*Citrus sinensis*	كالس ومعلق	(M)٢٠٠	G	(T ٣)+	+(أجنة) ونباتات		
٨	*C. aurantium*	كالس ومعلق	(M) ١٥٠	G	(T ٣) +	+(أجنة)		
٩	*Colocasia esculenta*	كالس ومعلق	ماء بحر تركيبي	G		+(نباتات)		
١٠	*Datura innoxia*	كالس (1n)	١٧١	OS	+(شهر واحد)	+(نباتات)	+(كالوس)	
١١	*Daucus carota*	كالس				+(نباتات)	+	
١٢	*D. carota*	كالس	ماء بحر تركيبي					
١٣	*D. carota*	معلق (1n)	DR → SR	G				
١٤	*Glycine max*	1n	$(NaNO_3)$٦٤					
١٥	*Ipomoea batatas*	معلق	١٧١	OS	(T ٣) +			
١٦	*Kickxia ramossima*	أنواع مختلفة	٢٤٠		(T ٣)+	+(نباتات)		
١٧	*Linum usitatissimum*		أملاح كبريتات	OS		+(نباتات)	+	+
١٨	*Lycopersicon esculentum*	معلق	DR → SR					
١٩	*L. esculentum*	فلقات	١٢٨	OS	+ (بموات)			
٢٠	*Medicago sativa*	كالس ومعلق	(H)١٧١	OS		+(نباتات)		
٢١	*M. sativa*	معلق				+(نباتات)	–	
٢٢	*M. sativa*	كالس	٨٥، و ١٧١	G	(T ٤)+	+(نباتات)		

تابع جدول (٥-١٧):

مسلسل	النوع	المزرعة[أ]	الملح أو الأملاح والتركيز (mM)[ب]	التعرض للملح OS: دفعة واحدة G: تدريجي	الثبات في بيئة خالية من الملح T: عدد النقلات G: عدد الأجيال	تجديد النمو (R_o)[جـ]	تحمل الـ R_o	الانتقال الجنسي
٢٣	*Nicotiana sylvestris*	معلق (In)	١٧١	G				
٢٤	*N. Sylvestris*	كالس ومعلق	١٧١، و ٣٤٢	OS	+(T ٣)			
٢٥	*N. tabacum*	معلق	(M)١٥٠	G		+(نباتات)	+	+
٢٦	*N. tabacum*	معلق وكالس	(SR→DR)١٣٠	G				
٢٧	*N. tabacum*	معلق	١٧١	G	- (T واحد)			
٢٨	*N. tabacum*	معلق	٦٠٠، و ٧٧٠	G				
٢٩	*N. tabacum*	معلق	٤٢٨	G	+ (G ١٠٠)	+(نباتات)	+	+
٣٠	*N. tabacum*	معلق	٢٠٠، و ٥٠٠	G	+ (G ٢٤، و G ٥٦)			
٣١	*N. tabacum*	كالس	(Na_2SO_4)٧٠	OS		+(نباتات)	+	+
٣٢	*N. tabacum*	معلق	Sjelenocystine، و Selenomethioine					
٣٣	*Oryza sativa*	كالس ومعلق	٢٥٦، و ٣٤٢ (H)					
٣٤	*O. sativa*	كالس	ماء بحر	OS			+	+
٣٥	*Pennisetum americanum*	معلق جنيني	٢٠٠	G	+(T ٧)	+(أجنة)		
٣٦	*P. purpureum*	كالس جنيني	٢١٤، و ٣٤٢(H)	OS، و G	–	+ (نباتات)	–	
٣٧	*P. purpureum*					+ (نباتات)	+	
٣٨	*P. purpureum*	كالس	٣٤٢	OS	+	+ (نباتات)	+	
٣٩	*Saccharum*	معلق وكالس	(H)٢٥٧	G				
٤٠	*Solanum melongena*	كالس	(H) ١٧١	G	+ (٤شهور)			
٤١	*S. tuberosum*	معلق(2n)	(M)					

تابع جدول (٥–١٧).

مسلسل	النوع	المزرعة[أ]	الملح أو الأملاح والتركيز (mM)[ب]	التعريض للملح OS: دفعة واحدة G: تدريجي	الثبات في بيئة خالية من الملح T: عدد النقلات G: عدد الأجيال	تجديد النمو (R_0)[ج]	تحمل الـ R_0	الانتقال الجنسي
٤٢	*S. tuberosum*	كالس ومعلق	(DR→SR)	G، و OS	(T_0)+			
٤٣	*Sorghum bicolor*	كالس	٨٦	OS		+ (نباتات)		+؟
٤٤	*Triticum aesativum*	كالس جنيني	١٠٣	G		+ (نباتات)		
٤٥	*Vitis rupensis*	كالس ومعلق	١٥٠	OS، و G	(T ٣)+	+ (أجنة)		
٤٦	Colt cherry	كالس وبروتوبلاست	٢٠٠(NaCl، و KCl، و Na_2SO_4)	OS		+ (نباتات)		
٤٧	*O. sativa*	كالس	٣٤٢ (M)	OS		+ (نباتات)		+

أ — الأنواع ١ إلى ٣٤: كونت كالس في بيئة ملحية؛ النوع ٣: سلالات الخلايا التي أنتجت برولين بكثرة كانت أكثر تحملاً لكبريتات الصوديوم؛ النوع ٤١: سلالات الخلايا المقاومة للـ hydroxyproline أظهرت تحملا أكبر لكل من كلوريد الصوديوم والصقيع.

ب — كان الملح المستخدم هو NaCl إلا إذا ذكر خلاف ذلك. التركيز المشار إليه هو إما التركيز الوحيد الذى تم استعماله أو أعلى تركيز استعمل فى سلسلة من التركيزات. M تعنى معاملة لاستحداث الطفرات mutagenic treatment، SR→DR، و DR→SR تعنى أن الخلايا المتأقلمة على الملوحة عرضت لشد جفافي أو العكس. H تعنى استجابة الخلايا كانت مماثلة لاستجابة الأنواع المحبة للملوحة halophytic response.

جـ — النوع ٢٠: كانت النباتات متقزمة وضعيفة وبطيئة النمو؛ النوع ٢٢: الشكل الظاهرى للنباتات غير طبيعى، مع عدم توازن كروموسومى وعقم؛ النوع ٢٦: شيخوخة وموت مبكرين؛ ٢٨: تباين فى القدرة على تحمل كلوريد الصوديوم بين أجزاء الجنين، و ٢٩: صفات كثيرة متغيرة، و ٣٤: ضعف الخصوبة وعدم ثبات صفة التحمل، والنوع ٤٣: فقدت نباتات أثناء أقلمتها، وكان بعضها ألبينو، وكانت الخضراء ضعيفة الخصوبة.

٦ – بناء على دراسات أجريت على مزارع خلايا التبغ فإن التركيز المعتدل من ملح الطعام (١٧١ مللى مولار) يؤدى إلى عزل سلالات متأقلمة على الملوحة تكون قادرة على العودة إلى حالتها الطبيعية بمجرد وقف التأثير الملحى؛ هذا . بينما يؤدى تعريض المزارع إلى تركيز عالٍ من نفس الملح (٤٢٨ مللى مولار) إلى عزل سلالات على درجة عالية من تحمل الملوحة نتيجة للجمع ما بين خاصيتى التأقلم (وهى التى تفقد بزوال المؤثر) وازدياد فى أعداد الخلايا المتحملة وراثيًّا للملوحة من بين تلك التى كانت متواجدة طبيعيًّا فى مزرعة الخلايا منذ البداية، وهى خاصية لا تفقد عند تجديد نمو الخلايا وزوال المؤثر

٧ – تضاربت آراء الباحثين بشأن كيفية تعريض مزارع الخلايا للتركيزات العالية من الأملاح أيكون مرة واحدة على صورة صدمة أسموزية، أم يجرى بصورة تدريجية؟ ولكن يعتقد بأن إعطاء المعاملة بالتركيز المرتفع مرة واحدة يزيد من نسبة الخلايا "المقاومة" على حساب الخلايا التى يحدث فيها "تأقلم" مؤقت

٨ – كان مقياس تحمل التركيزات العالية من الأملاح فى معظم الدراسات هو أعداد الخلايا أو وزنها الطازج أو الجاف خلال فترة زمنية معينة؛ نظرا لتأثر معدل النمو بمدى مقاومة الخلايا للملوحة أو تأقلمها عليها.

٩ – تُقاس خاصية ثبات القدرة على تحمل الملوحة بتجديد زراعة المزرعة عدة مرات فى بيئة خالية من الملح، ثم إعادة زراعتها فى وجود الملح. علمًا بأن هذا الاختبار يميز بسهولة بين خاصيتى "المقاومة" و "التأقلم"؛ نظرا لأن الأخيرة تفقد سريعا خلال فترة تجديد النمو فى غياب الملح.

١٠ – على الرغم من السهولة التى يتم بها عزل سلالات خلايا متحملة للملوحة العالية، فإن نسبة ما أمكن تجديد النمو منها قاربت من النصف، بينما لم تنتقل تلك الخاصية جنسيًا – عن طريق البذور – سوى فى حالات قليلة فقط. ويعد السبب الرئيسى فى ذلك هو تردى نمو النباتات التى يتجدد نموها من تلك المزارع وانخفاض نسبة الخصوبة فيها وبينما يكون من الصعوبة بمكان الاحتفاظ بالنباتات التى تعانى من الاضطرابات الكروموسومية بما تسببه من مشاكل فى النمو والخصوبة، فإن كثيرًا من

حالات اضطرابات النمو الأخرى قد ترجع إلى أسباب تقنية تتعلق بالبيئات المستخدمة ومكوناتها وظروف عمليات تجديد النمو والأقلمة، وهى أمور يمكن — غالبًا — التحكم فيها (عن Tal ١٩٩٠).

هذا . ومازالت الجدوى الاقتصادية للنباتات المتحملة للملوحة المنتخبة من مزارع الأنسجة أمرًا مجهولاً، حيث لا يعرف على وجه التحديد الثمن الذى يدفعه النبات — فى صورة نقص فى معدل النمو — عندما يُصبح متحملاً للشد الملحى (عن Remotti ١٩٩٨)

طريقة معاملة المزارع بالأملاح لأجل الانتخاب لتحمل الملوحة

تتباين آراء الباحثين بشأن طريقة معاملة مزارع الأنسجة بالأملاح لأجل الانتخاب لتحمل الملوحة بين من يرى ضرورة إجراء المعاملة بالتركيز المطلوب (وهو الذى يكفى لقتل ٥٠–٩٥٪ من الخلايا) مرة واحدة، ومن يرى ضرورة الوصول لهذا التركيز بصورة تدريجية يدافع أصحاب الرأى القائل بضرورة تعريض المزرعة للتركيز الملحى العالى مرة واحدة بأن ذلك يسمح بقصر الانتخاب على الخلايا ذات القدرة العالية على تحمل الملوحة، بينما يعطى تعريض المزرعة لتركيزات متزايدة من الأملاح الفرصة للخلايا لأن تتأقلم على الملوحة العالية — وهو أمر يحدث بصورة طبيعية عند التعرض التدريجى لأى شدٍ بيئى — وبذا فإن كثيرًا من الخلايا الحساسة أصلا للملوحة العالية قد يتم انتخابها على أنها متحملة هذا بينما يرى أصحاب الرأى الثانى أن التعرض الفجائى للتركيز العالى من الأملاح قد لا يعطى الخلايا ذات القدرة الوراثية العالية على تحمل الملوحة الفرصة لأن تهئ نفسها لتحمل تلك التركيزات الملحية العالية؛ فتموت قبل أن تُظهر تلك القدرة ولا شك أن ترجيح أحد الرأيين على الآخر يتطلب فهمًا أفضل لظاهرة التأقلم (عن Gulati وآخرين ١٩٩٧).

إن الانتخاب لتحمل الملوحة فى مزارع الأنسجة يؤدى — فى كثير من الأحيان — إلى حدوث تأقلم مؤقت للتركيزات العالية من الأملاح، حيث تكون الخلايا قادرة على تخزين الملح الزائد فى الفجوات العصارية، وتحتفظ بقدرتها على البقاء بتعديل الضغط

الأسموزى. ويؤدى هذا التأقلم إلى تقليل الانقسام الخلوى وزيادة مدته. وفى إحدى الدراسات حُصل على سلالات خلايا تبغ متحملة لتركيز ١٠ جم/لتر من كلوريد الصوديوم، ولكنها عادت إلى حالتها الطبيعية باختفاء حالة الشدّ الملحى. وبزيادة تركيز كلوريد الصوديوم إلى ٢٥جم/لتر حُصل على سلالات متحملة للملوحة وثابتة (Jain ٢٠٠١).

وتتأثر الاستجابة للشدّ الملحى فى مزارع الأنسجة بكل من العوامل التالية:

١ — نوع الملح المستخدم.
٢ — مدة التعرض للشدّ الملحى.
٣ — تركيب بيئة الزراعة.
٤ — الظروف البيئية التى تتعرض لها المزرعة.
٥ — مصدر الجزء النباتى المستخدم فى الزراعة (الـ explant)
٦ - تركيز المعلق الخلوى.
٧ — مرحلة النمو الزرعى.

وللتفاصيل المتعلقة بدور كل واحد من تلك العوامل . يراجع Gulati & Jaiwal (١٩٩٧)

مستوى التعبير عن تحمل الملوحة . التعبير على المستويين الخلوى والنبات الكامل

عند الانتخاب لتحمل الملوحة فى مزارع الأنسجة يجب أن تكون خاصية التحمل فى النباتات المكتملة النمو قائمة على أساس خلوى، أى أن تكون تلك الخاصية متماثلة على كل من المستويين: الخلوى والنبات الكامل، وهو أمر قد لا يتحقق فى كثير من الحالات. ولعل ذلك هو السبب فى أن الانتخاب لتحمل الملوحة فى مزارع الأنسجة لا يقود — غالبًا — إلى تحسين تلك الخاصية فى النباتات البالغة (Dracup ١٩٩٣)

وعندما يوجد ارتباط موجب بين تحمل مزارع الخلايا للملوحة وتحمل النبات الكامل، فإن ذلك يكون دليلاً على اعتماد كليهما على خاصية واحدة مشتركة تكون هى المسئولة عن تحمل الملوحة. ولكن عندما يكون الارتباط سالبًا — كأن يكون النبات الكامل

متحملاً للملوحة. بينما تكون الخلايا المفردة حساسة – فإن ذلك يكون دليلا على أن خاصية تحمل الملوحة تعتمد على انتظام الخلايا على صورة أنسجة والأنسجة على صورة أعضاء فى النبات الكامل

ومن الأمثلة التى حُصل فيها على مختلف حالات الارتباط بين تحمل الملوحة فى كل من النبات البالغ وسلالات الخلايا، ما يلى (عن Tal ١٩٩٠).

١ – الارتباط موجب

أ – النبات مُتحمل والخلايا متحملة : *Lycopersicon pennellii*، و *L. peruvianum*، والبنجر، والبرسيم الحجازى، ولفت الزيت.

ب – النبات حساس والخلايا حساسة : الطماطم، والفاصوليا، والشعير

٢ – الارتباط سالب

أ – النبات مُتحمل والخلايا حساسة : *L. pennellii*

ب – النبات حساس والخلايا متحملة : الفاصوليا، والأرز.

الأساس الفسيولوجى لتحمل الملوحة

بتراكم البرولين فى مزارع أنسجة كلا من النباتات العادية glycophytic، والنباتات المحبة للملوحة halophytic عندما تتعرض لتركيزات عالية من أى من كلوريد الصوديوم أو كبريتات الصوديوم. وتؤدى إضافة البرولين إلى بيئات زراعة الأنسجة المحتوية على تركيزات ملحية عالية إلى تحفيز نمو وبقاء الخلايا والأنسجة والنباتات الكاملة. ويستدل من ذلك على أن البرولين ربما يوفر الحماية للأنسجة النباتية من حالات الشدِّ الملحى بالعمل كمركب خازن للنيتروجين، وكمحلول أسموزى، وكحام للإنزيمات والتركيب الخلوى ولذا فإن الطفرات التى تُنتج البرولين بوفرة ربما تكون أكثر تحملا للملوحة وقد أمكن عزل طفرات كهذه بتمريض الخلايا لنظائر البرولين proline analogues، التى تسبب تثبيطا لعمل الإنزيمات المنظمة لتمثيل البرولين. كما قد يُنتج البرولين بوفرة نتيجة لزيادة نشاط الإنزيمات المسئولة عند تمثيله، أو تثبيط الإنزيمات التى تعمل على تحلله

ولقد أمكن الحصول على قدر أكبر من المقاومة للملوحة العالية فى سلالات خلايا طفرية يتراكم فيها البرولين فى عديد من الأنواع النباتية، منها: الشعير، والجزر، والبطاطس، و *Nicotiana sylvestris*، و *Vigna radiata*، و *Arabidopsis thaliana*. ووجد أن سلالات القمح التى كانت مقاومة للهيدروكسى برولين hydroxyproline تراكم بها البرولين بتركيزات وصلت إلى ١٧ ضعف التركيز العادى وكانت متحملة للصقيع. هذا .. إلاّ أن سلالات الأرز المقاومة للهيدروكسى برولين والتى تراكم فيها البرولين بتركيزات وصلت إلى ١٥–٣٠ ضعف التركيز العادى لم تكن متحملة للشدّ الناتج من أى من الملوحة، أو المانيتول، أو الـ PEG، أو الصقيع.

وقد انتخبت تباينات مزارع من *Brassica juncea* كانت ذات محتوى أعلى من البرولين الحر تحت ظروف الشدّ الملحى عن النباتات الأصلية، وكانت تلك الزيادة فى مستوى البرولين راجعة إلى زيادة فى نشاط الإنزيم pyrroline-5-carboxylate reductase الذى يحفز الخطوة الأخيرة فى مسار تمثيل البرولين.

وعلى خلاف ما تقدم بيانه .. فإن السلالات المتحملة للملوحة من كل من *N. sylvestris* والباذنجان لم يتراكم بها البرولين بدرجة أكبر عما فى السلالات غير المنتخبة، بما قد يعنى أن البرولين لا يلعب دورًا فى عملية الأقلمة على الشدّ الملحى (أو البيئى عمومًا)، وأنه ربما يكون مجرد مظهر من مظاهر الشدّ (عن Gulati & Jaiwal ١٩٩٧).

كذلك لوحظ فى بعض تباينات المزارع المتحملة للملوحة تراكمًا فى بروتين معين (٢٤ كيلودالتون) أطلق عليه اسم أوزموتين ١ (Osmotin-I)، وفى حالات أخرى كانت صفة التحمل مصاحبة بتغيرات إنزيمية، أو بتواجد تركيز عال من البرولين. كذلك وجدت حالات تتحمل الملوحة العالية نَشَطَت فيها جينات استبعاد الكلورين chlorine-excluder genes، وتواجدت فيها مركبات حامية من الضغط الأسموزى العالى (osmoprotectants) مثل الجليسين بيتين glycene-betaine (عن Remotti ١٩٩٨).

وللإطلاع على نتائج مزيد من الدراسات التى أجريت فى هذا المجال .. يراجع — كذلك — Gulati & Jaiwal (١٩٩٧).

تحمل الحرارة المنخفضة

أظهرت الدراسات أن مستوى الأحماض الأمينية — وبخاصة البرولين -- يزداد أثناء عملية التأقلم على الحرارة المنخفضة، ولقد وجد ارتباط جوهرى عال بين مستوى البرولين وتحمل الصقيع فى تراكيب وراثية تمثل مدى واسعا من الأنواع النباتية وبالانتخاب فى مزارع الأنسجة لزيادة محتوى كل من البرولين والهيدروكسى برولين اللذان يرتبطان بتحمل الصقيع أمكن إنتاج سلالات خلايا من القمح تحمل صفه القدرة الوراثية على تحمل الصقيع (عن Chawla ٢٠٠٠)

ولقد أمكن الاستفادة من المعلمات الكيميائية الحيوية الخاصة بتراكم البرولين فى الانتخاب فى المزارع للقدرة على تحمل الصقيع وفى خدمة ذات الهدف أمكن انتخاب سلالات خلايا قادرة على تراكم البرولين بها بمعاملة المزارع بالهيدروكسى برولين hydroxyproline وفى الذرة .. أمكن عزل سلالات مزارع متحملة للبرودة ويتراكم فيها البرولين بمعاملة الكالس بكل من حامض الأبسيسك والمانيتول mannitol

كذلك أمكن الحصول على نباتات قمح متحملة للتجمد من نسيج كالس خضع لعملية التبريد الشديد إلى -١٩٦ دون معاملة بالمواد الحامية من أضرار تلك المعاملة (أى دون معاملته بالـ cryprotectants)، وقد انتقلت تلك الصفة إلى النباتات التى تجدد نموها من ذلك الكالس وإلى نسلها (عن Remotti ١٩٩٨)

تحمل الحرارة العالية

أمكن انتخاب نباتات قطن مقاومة للحرارة بمعاملة مزارع الكالس بحرارة عالية وصلت إلى ٤٥م. حيث تجدد نمو النباتات المقاومة من الخلايا التى تحملت المعاملة الحرارية، إلاّ أن كثرة حدوث المظاهر السيتولوجية غير الطبيعية فى تلك النباتات أحدثت خفضا شديدا فى خصوبتها (عن Remotti ١٩٩٨).

تحمل الجفاف

من الوسائل الفعالة فى الانتخاب لتحمل الجفاف إضافة البوليثيلين جليكول إلى بيئة

الزراعة، حيث يُحدث شدً أسموزيًا، مما يعمل فى صالح انتخاب الخلايا التى تتحمل ظروف الجفاف   تحقق ذلك فى عدد من المحاصيل، من بينها الأرز والقمح (Remotti ١٩٩٨).

تحمل التركيزات العالية من الحديد والألومنيوم فى الأراضى الحامضية

يؤدى كثرة تيسر بعض العناصر — كالحديد والمنجنيز والألومنيوم — فى الأراضى الحامضية إلى تراكمها بتركيزات سامة للنباتات، وفى حالات كهذه .. يفيد الانتخاب فى مزارع الأنسجة فى الحصول على تباينات قادرة على تحمل التركيزات العالية من تلك العناصر. ولقد أمكن بالفعل انتخاب سلالات من عديد من الأنواع النباتية مقاومة للتركيزات العالية من الألومنيوم، من بينها: الطماطم، والأرز، والبطاطس، والجزر.

وفى حالة الجزر المتحمل للألومنيوم فإن خلايا الجزر تفرز حامض ستريك يعمل كعامل مخلبى لخفض تركيز أيون الألومنيوم فى بيئة الزراعة؛ ومن ثم فإنه تفقد سميتها هذا .. إلاّ أن امتصاص النبات لكميات كبيرة من تلك العناصر وحجزها فى المسافات التى بين الخلايا يمكن أن يشكل خطورة صحية على الإنسان والحيوانات التى تستهلك تلك النباتات (عن Remotti ١٩٩٨).

تحمل مبيدات الحشائش

تهدف شركات إنتاج مبيدات الحشائش — غالبًا — إلى تطوير أصناف محصولية مقاومة للمبيدات فى الوقت ذاته التى تُنتج فيه تلك المبيدات. وقد أثبت الانتخاب فى المزارع فاعلية كبيرة فى هذا الشأن؛ فقد ثبت عدم كفاية التباينات الطبيعية — فى غياب الشدّ الانتخابى — فى توفير المقاومة لمبيدات الحشائش وفى المقابل .. فإن المواد الفعالة التى توجد فى مبيدات الحشائش والتى تضاف إلى مزارع الأنسجة لا تعمل - فقط - كعوامل شدٍّ انتخابى، وإنما كذلك — وفى آن واحد - كعامل مطفر، حيث تؤدى إلى ظهور التباينات المرغوب فيها بنسبة تتراوح بين واحد فى كل ١٠ مليون إلى واحد فى كل مليون.

وبينما نجد من السهولة كثيرا انتخاب تباينات مزارع مقاومة لمبيدات الحشائش، فإن غالبية التباينات التى أنتجت بالفعل لم يتجدد نمو نباتى منها، ومن تلك التى تجدد نموها لم تصل المقاومة إلى أنسال النباتات المنتجة إلا فى حالات قليلة؛ بما يعنى عدم إمكان الاستفادة من تلك الصفة وعدم القدرة على دراسة وراثتها. وفى معظم الحالات التى درست كانت صفة المقاومة بسيطة وسائدة، أو ظهرت نتيجة لحدوث طفرات فى دنا الكلوروبلاستيدات الخضراء.

وأحيانًا ظهرت مقاومة لأكثر من مبيد فى آن واحد، نتيجة لحدوث طفرة تؤثر فى فاعلية تلك المبيدات. ومن الأمثلة على ذلك المقاومة التى حصل عليها فى الذرة لكل من الـ sulphonylurea والـ imidazolines نتيجة لحدوث انخفاض فى حساسية الإنزيم acetohydroxy acid synthase لكليهما. كذلك أظهر الجين HuR فى التبغ مقاومة لكل من الـ hydroxyurea، والـ picloram (عن Remotti ١٩٩٨).

أمثلة على تباينات مزارع متحملة لمبيدات الحشائش

يظهر فى جدول (٥-١٨) بعض الأمثلة لحالات تحمل مبيدات الحشائش التى أمكن الانتخاب لها فى مزارع الأنسجة وكانت ثابتة وراثيًا.

من بين أهم الحالات التى أمكن فيها الحصول على سلالات نباتية مقاومة لمبيدات الحشائش بالانتخاب فى تباينات مزارع الأنسجة التبغ المقاوم لكل من الجلايفوسيت glyphosate، والسلفونيل يوريا sulfonylurea، والهيدروكسى يوريا hydroxyurea، والباراكوات paraquat، والبكلورام picloram، وكذلك الجزر المقاوم للجلايفوسيت.

كما أمكن انتخاب سلالة كالس خلوية من الطماطم تحملت تركيزات من كلوريد الصوديوم وصلت إلى ١٠٠٠٠ جزء فى المليون. وقد أظهرت تلك السلالة بعضًا من صفات النباتات المحبة للملوحة halophytes، والتى تمثلت فيما يلى:

١ – النمو الأفضل للكالس فى البيئات التى احتوت على تركيز ٨٠٠٠ جزء فى المليون من كلوريد الصوديوم، مقارنة بالنمو فى البيئات التى احتوت على تركيز ٦٠٠٠ جزء فى المليون.

٢ – احتفاظها بتركيزات عالية من البوتاسيوم فى وجود تركيزات عالية من الصوديوم.

٣ – تراكم البرولين فيها بتركيزات عالية فى جميع مستويات كلوريد الصوديوم، مقارنة بالسلالات الكالوسية الأخرى التى لم تنتخب لتحمل كلوريد الصوديوم (El-Bahr وآخرون ١٩٩٣).

جدول (٥–١٨): أمثلة لحالات انتخاب تباينات مزارع مقاومة لمبيدات الحشائش (عن **Remotti** ١٩٩٨)

النوع النباتى	مبيد الحشائش	وراثة المقاومة
Arabidopsis thaliana	Chlorsulfuron	بسيطة سائدة
Beta vulgaris	Chlorsulfuron	بسيطة سائدة
Brassica napus	Chlorsulfuron	سائدة جزئيًّا
Glycene max	Atrazine	ليست بسيطة سائدة
Linum usitatissium	Chlorsulfuron	بسيطة سائدة
Lotus corniculatus	Chlorsulfuron	بسيطة سائدة
Lycopersicon esculentum	Paraquat	طفرات سائدة
Nicotiana tabacum	Picloram	بسيطة سائدة
	Hydroxyurea	بسيطة سائدة
	Chlorsulfuron	بسيطة سائدة
	Sulfometuron methyl	بسيطة سائدة
	Amitrole	ليست مندلية
	Atrazine	طفرات كلوروبلاستيدية
	Paraquat	سائدة
Oryza sativa	Bensulfuron methyl	طفرات متنحية
Solanum tuberosum	MCPA & OMNIDEL	--
Zea mays	Sethoxydim & haloxyfop	سائدة جزئيًّا
	Imidazolinone	بسيطة سائدة
	Chlorsulfuron	بسيطة سائدة جزئيًّا
	Glyphosate	—

ومن الحالات الأخرى التى انتخبت فيها سلالات خلايا مقاومة لمبيدات الحشائش. المقاومة للـ sulfonylurea فى الكتان ولفت الزيت، والمقاومة للـ imazaquin فى الذرة

وعلى الرغم من أن نقل جينات المقاومة لمبيدات الحشائش بطرق الهندسة الوراثية يعد أمرا ممكنًا وأكثر إحكاما، إلاّ أن الاعتراضات التى تواجه استعمال الكائنات المحولة وراثيًا تجعل اللجوء إلى الانتخاب لصفة المقاومة أمرًا مفضلاً . على الأقل فى الوقت الحالى (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢)

ولقد أمكن عزل سلالة خلايا من الشيكوريا مقاومة لمبيد الحشائش chlorsulfuron، وذلك من مزرعة خلايا لم تُعَّرض لأية عوامل مطفرة،وقد وجد أن تلك الصفة بسيطة وشبه سائدة semi-dominant. وأوضحت الدارسات أن النباتات السائدة الأصيلة تتحمل المبيد بتركيزات تصل إلى ١٥٠٠–٢٠٠٠ ضعف التركيز الذى يمكن أن تتحمله النباتات الحساسة. بينما كانت تلك النسبة حوالى ٣٠٠ بالنسبة للنباتات الخليطة فى الصفة وقد تأكد أن النباتات الحاملة لتلك الصفة كانت مقاومة — كذلك – لسبعة مبيدات أخرى من الـ sulfonylureas، ومبيد من الـ imidazolinone؛ بما يعنى أن تلك المقاومة ترجع إلى طفرة فى الجين المتحكم فى إنزيم معين يتحكم فى فاعلية تلك المبيدات (Lavigne وآخرون ١٩٩٤).

طبيعة تحمل مبيدات الحشائش

إن الانتخاب لتحمل مبيدات الحشائش فى مزارع الأنسجة يعتمد على قدرة الخلايا المنتخبة لزيادة تعبيرها لجينات معينة تكون هى المسئولة عن تمثيل إنزيمات معينة؛ مثل إنزيم glutamine synthetase فى حالة مقاومة سلالات خلايا البرسيم الحجازى لمبيد الحشائش phosphinothricin ت

وتعتمد طبيعة المقاومة لمبيدات الحشائش على طبيعة فعل المبيد ذاته، وقد تحتوى تباينات المزارع المقاومة على تحويرات فى القدرة على نقل المبيد داخل النبات، أو فى إنزيمات معينة، أو فى القدرة على التخلص من سمية المبيد. وعندما يعمل المبيد على المستوى الخلوى، فإن الانتخاب فى المزارع يعنى استمرار المقاومة فى النباتات الكاملة

هذا   ولا يمكن الاعتماد على مزارع الأنسجة فى الانتخاب لمقاومة المبيدات التى تتعارض مع نظام انتقال الإليكترونات فى عملية البناء الضوئى إلاّ إذا أظهر الكالس نشاطًا في عملية البناء الضوئي. وفي المقابل .. يعد الانتخاب فى المزارع سهلاً وفعالا بالنسبة للمبيدات التى تؤثر فى إنزيمات معينة، مثل مبيدات الكلوروسلفورون chlorosulphuron التى تؤثر فى إنزيمات مثل الـ acetolactae synthase (عن Remotti ١٩٩٨)

مصادر إضافية

لمزيد من التفاصيل فى موضوع تباينات المزارع . يمكن الرجوع إلى المصادر التالية.

المرجع	الموضوع
Dix (١٩٨٠)	الانتخاب فى مزارع الأنسجة لتحمل الظروف القاسية
Earle & Graeen (١٩٨١)	الانتخاب فى مزارع الأنسجة لقاومة الأمراض
Maliga وآخرون (١٩٨٢)	تباينات المزارع والاستفادة منها فى تحسين النباتات
Scowcroft (١٩٨٢)	تباينات المزارع كوسيلة لتحسين النباتات
Bright وآخرون (١٩٨٣)	التحسين فى الصفات المحصولية عن طريق تباينات المزارع
Carlson (١٩٨٤)	الانتخاب فى تباينات المزارع
Griesbach (١٩٨٤)	استخدامات مزارع الأنسجة فى مجال الدراسات الوراثية
Stavarek & Rains (١٩٨٤)	الانتخاب فى مزارع الأنسجة لتحمل الظروف البيئية القاسية
Ledoux (١٩٨٤)	تباينات مزارع الأنسجة
Duncan & Wdholm (١٩٨٦)	الانتخاب فى تباينات المزارع
Gulati & Jaiwal (١٩٩٧)	الانتخاب لتحمل الملوحة فى مزارع الأنسجة
Jain وآخرون (١٩٩٨)	تباينات المزارع التى تحدث بصورة طبيعية والمستحدثة فيها
Brar & Jain (١٩٩٨)	طبيعة تباينات المزارع وتطبيقاتها فى مجال تربية النبات
Gupta (١٩٩٨)	الأساس الكروموسومى لتباينات المزارع
Remotti (١٩٩٨)	تحسين الصفات المحصولية بالانتخاب للصفات المرغوب فيها فى المزارع ذاتها
Jain وآخرون (١٩٩٨)	تباينات المزارع فى المحاصيل الزراعية – عام
Ahlowwalia (١٩٩٨)	استحداث الطفرات فى مزارع أنسجة النباتات الخضرية التكاثر
Cassells (١٩٩٨)	استحداث الطفرات فى مزارع الأنسجة لمقاومة الأمراض
Henry (١٩٩٨)	التوصيف الجزيئى والكيميائى الحيوى لتباينات المزارع باستخدام تقنيات الدنا
Jayasankar (٢٠٠٥)	تباينات مزارع الأنسجة



الفصل السادس

الإكثار الدقيق

تمهيد

يتم إكثار السلالات الجديدة من المحاصيل التى لا تتكاثر جنسيًا، إما خضريًا Vegetatively وإما لاإخصابيًا Apomictically، وتفيد كلتا الطريقتين فى إنتاج سلالات متجانسة تمامًا ومشابهة للأصل الذى توصل إلية المربى، والذى استخدم فى الإكثار. ويعطى الإكثار الخضرى سلالات خضرية Clones، بينما يعطى الإكثار اللاإخصابى سلالات لاإخصابية Apomictic Lines.

ويعاب على التكاثر الخضرى أن إنتاج أعداد كبيرة من نباتات الصنف الجديد تصلح للزراعة التجارية على نطاق واسع يستغرق عدة سنوات، لا يستفاد خلالها من الصنف الجديد. كما قد تصاب النباتات خلال عملية الإكثار بالفيروسات، مما يترتب عليه انتشار الإصابة الفيرسية بين نباتات الصنف الجديد.

أما التكاثر اللاإخصابى .. فيعيبه قلة الأنواع النباتية التى تتكون بها الأجنة اللاإخصابية، فضلاً على صعوبة التمييز بين البادرات التى تنمو من أجنة جنسية، وتلك التى تنمو من أجنة لاإخصائية فى حالة التكاثر اللاإخصابى الاختيارى. ومن العيوب الأخرى للتكاثر اللاإخصابى — مقارنًا بالتكاثر الخضرى — طول فترة سكون البذور فى بعض الأنواع، ووجود مرحلة حداثة Juvenile Phase طويلة فى أنواع كثيرة عند إكثارها بالبذور

أما الإكثار الجنسى .. فلا يصلح لهذه الأنواع التى تكثر تجاريًا بوسائل غير جنسية لأنه يؤدى إلى إنتاج نباتات مخالفة للصنف الأصلى، فضلاً على أن كثيرًا من الأنواع النباتية لا تنتج بذورًا بالمرة؛ مثل الموز، والعنب البناتى، والتين.

تتضح من المناقشة السابقة أهمية الإكثار الدقيق فى إكثار الأصناف الجديدة وإنتاج

آلاف أو ملايين النباتات الصالحة للزراعة من قطعة مجهرية الحجم من النسيج النباتي في وقت قصير للغاية

إن تطبيق تقنيات مزارع الأنسجة على برامج تربية وتحسين النباتات يعتمد أساسا على توفر التقنيات التى تلزم لتجديد نمو نباتات كاملة من تلك المزارع. ويعرف الإكثار النباتي من خلال مزارع الأنسجة باسم الإكثار الدقيق micropropagation وتعد النباتات التى تنتج بتلك الطريقة — وهى مازالت فى المزارع — مجرد صورة مصغرة جدًا (منمنمة) للنباتات العادية

وقد بدأ استخدام هذه الطريقة مع نبات الأوركيد Orchid ثم انتشر استخدامها فى معظم النباتات الاقتصادية المهمة، التى لا تكثر جنسيًا مثل نخيل البلح والموز ونخيل الزيت وعديد من الفواكه الأخرى، ونباتات الزينة مثل الجربيرا، وبذلك أمكن تقليل الفترة ما بين إنتاج الأصناف الجديدة، وانتشار زراعتها

كما أفادت هذه الطريقة فى التوسع فى زراعة الأصناف الجديدة خارج حدود الدول التى أنتجت فيها، نظرًا لسهولة إجراءات الحجر الزراعى على النباتات النامية فى أنابيب الاختيار وكان من المزايا الأخرى للإكثار الدقيق المحافظة على النباتات خالية من جميع الإصابات المرضية، واستمرار عملية الإكثار على مدار العام، دون التقيد بالمواسم الزراعية

ويعد إنتاج نباتات من الجنس المطلوب من أكبر مزايا الإكثار الدقيق بالنسبة للأنواع الوحيدة الجنس الثنائية المسكن، حيث تنتج — مثلاً — نباتات مذكرة فقط من لهليون، ونباتات مؤنثة فقط من نخيل البلح، كما يطمح الباحثون فى إنتاج نباتات مؤنثة فقط من الباباظ

ولاشك فى أن المحافظة على عشرات الآلاف من نباتات المشاتل فى أوعية زجاجية صغيرة فى مساحة من المختبر لا تتعدى عشرة أمتار مربعة يعد أمرا بالغ الأهمية من الوجهة الاقتصادية وإلى جانب ما تقدم . فإن مزارع الإكثار الدقيق يمكن الاستفادة منها فى إكثار هجن بعض الأنواع الجنسية التكاثر المرتفعة الثمن، كهجن القنبيط،

والسلالات العقيمة الذكر المستخدمة كأمهات، بدلاً من اتباع طريقة التهجين الرجعي كما في البصل.

وفي مجال إكثار الهجن الجنسية تجرى محاولات لإنتاج بذور صناعية artificial seeds من هذه الهجن باتباع طرق الإكثار الدقيق ويعمد العلماء — في هذه الحالة — إلى إنتاج أجنة جسمية من خلايا الهجين الجنسي مباشرة بزراعة أنسجته (مثل نسيج الأوراق الفلقية) في البيئات المناسبة؛ وبذا .. يمكن الحصول على عدد كبير من الأجنة الجسمية من كل نبات هجين جنسي. تغلف هذه الأجنة بعد ذلك بأغلفة مناسبة — وهي العملية التي تعرف باسم encapsulation — ثم تزرع كالبذور العادية.

وللإكثار الدقيق دوره المباشر في مجال تربية بعض الأنواع الحولية التي يتطلب تقييمها للصفات المرغوبة أن تحصد وتزال من الحقل (كما في الخس، والكرنب، والكرفس) وهو ما يؤدي إلى فقدان قدرتها على النمو ومن أمثلة ذلك صفات الصلاحية للتخزين، والقدرة على تحمل عمليات التداول والشحن، والمقاومة للعيوب الفسيولوجية والأمراض التالية للحصاد وبرغم أنه يمكن أحيانًا الإبقاء على جزء من النبات في الحقل لحين إجراء التقييم . إلا أن هذه الطريقة مكلفة. وتتطلب جهدًا إضافيًا وتقدم مزارع الإكثار الدقيق حلاً جيدًا لهذه المشكلة؛ بإكثار النباتات التي يتم انتخابها — بعد التقييم المختبري — من القمم النامية، أو البراعم الإبطية لهذه النباتات. وتحقيقًا لهذا الهدف قام Bloksberg & Saltveit (١٩٨٦) بتطوير تقنية إكثار نباتات الخس من البراعم الإبطية التي توجد في الرؤوس.

ويفيد الإكثار الدقيق كذلك في التغلب على مشاكل تقييم النباتات التي عمّرت سنوات كثيرة، خاصة أشجار الغابات؛ ففي هذه الأنواع .. تميل النباتات الجديدة إلى مشابهة النمو النباتي في الجزء الذي استخدم في الإكثار الخضري من النبات الأم؛ مما يؤدي إلى حدوث تباين واضح في النمو النباتي بين نباتات السلالة الخضرية الواحدة ويمكن التغلب على هذه المشكلة بالإكثار الدقيق لهذه الأشجار؛ لأنه يؤدي إلى استعادة مرحلة الحداثة Juvenility في جميع النباتات الجديدة المكثرة (عن Jensen ١٩٨١).

ويفضل دائمًا استخدام القمة الميرستيمية في الزراعة، لكي تكون النباتات المنتخبة خالية من الفيروسات. أما إن لم يكن ذلك ضروريًا .. فإن يمكن استعمال أجزاء صغيرة من ساق النبات، تحتوى كل منها على عقدة وبرعم جانبي (nodal segments)، ذلك لأن البراعم الجانبية المفصولة بمفردها من الأشجار البالغة لا تنمو في معظم الحالات، بينما يساعد النسيج الأمي الموجود مع البرعم الإبطي في هذه العقل (nodal cuttings) على نمو البرعم وتتحمل البراعم الجانبية عمليات التعقيم أفضل من البراعم الطرفية ويمكن استعمال أى جز نباتي آخر في التكاثر الدقيق إذا أمكن دفعه لتكوين براعم عرضية، سواء تكونت من خلال نسيج الكالس، أم بدونه. وتستخدم لهذا الغرض أجزاء من الجذور، والسيقان، والأوراق .. ويتوقف الاختيار على قدرة العضو النباتي على تكوين براعم عرضية

ولقد كان أول التطبيقات الواسعة للتكنولوجيا الحيوية في مجال الإكثار الدقيق لنباتات الزينة، وكانت أكثر التقنيات استخدامًا في هذا المجال مزارع النموات الخضرية shoot culture، وهى التى تكثر فيها النموات الجديدة (من العقل الصغيرة جدًا microcuttings) من خلال تحفيز نمو براعم إبطية من السيقان المزروعة.

وتعد تكلفة تداول العقل الصغيرة وزراعتها أكبر محددات مزارع النموات الخضرية لأجل الإكثار الدقيق، حيث تشكل العمالة — وحدها — أكثر من ٦٠٪ من تكلفة الإنتاج الكلية، الأمر الذى حدا بالعلماء إلى محاولة أتمتة تلك العملية باستخدام الروبوتات (الإنسان الآلى) وعلى الرغم من نجاح الروبوتات على المستوى التجريبى، فإن تكلفتها العالية أعاقت استعمالها تجاريًا، هذا فضلاً عن الحاجة إلى التقييم النوعى للنسيج المستخدم فى الزراعة، وضرورة تجانس الأجزاء النباتية explants المزروعة

وللتغلب على مشكلة عدم تجانس الأجزاء النباتية المستعملة فى الزراعة (الـ explants) .. كان الاتجاه إلى استخدام الأجنة الجسمية ومزارع العقد nodal cultures (عقدة مع جزء صغير جدًا من الساق) فى بيئات سائلة.

وقد صاحبت تقنيات الإكثار الدقيق تطور تقنيات التخلص من مسببات الأمراض،

مثل: مزارع القمة الميرستيمية، والعلاج الحرارى thermotherapy (عن McCown ٢٠٠٣)

هذا .. ويزيد عدد الأنواع النباتية التى أكثرت بطريقة الإكثار الدقيق عن الآلف. وعلى الرغم من كثرة أعداد معامل وشركات الإكثار الدقيق للأغراض التجارية، فإن الكثير منها لا يقوى على المنافسة، لأسباب كثيرة تتعلق بتكلفة الإنتاج مقارنة بالإكثار بالطرق العادية، وزيادة العرض، وضرورة تسويق ونقل وتوزيع أعداد هائلة من النباتات خلال فترة قصيرة من الزمن، والحاجة إلى الاستخدام الأمثل للقوة العاملة، خاصة وأنها تشكل — غالبًا — حوالى ٥٠٪ من تكلفة الإنتاج فى شركات الإكثار الدقيق (Kitto ١٩٩٧).

مراحل الإكثار الدقيق

يمر الإكثار الدقيق فى مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية بخمس مراحل متداخلة فيما بينها، كما يلى:

أولاً: مرحلة التأسيس Establishment Stage (أو Stage I)

إن وظيفة هذه المرحلة هى ثبات واستطراد نمو (تأسيس وترسيخ) جزء نباتى مزروع ومعقم (explant) فى بيئة للزراعة، حيث ينمو طوليًا ويظهر واضحًا للعين

ثانيًا: مرحلة التضاعف Multiplication (أو Stage II)

إن وظيفة مرحلة التضاعف هى زيادة أعداد النموات النباتية تمهيدًا لتجذيرها فى مرحلة لاحقة. يقسم الـ explant — الذى نما طوليًا فى المرحلة الأولى — إلى عدة أجزاء تزرع مستقلة فى بيئة جديدة ويتوقف تضاعف النموات الخضرية المتكونة إما على الإنتاج المستمر للنموات الإبطية، وإما على تكوين نموات عرضية من الكتل الكالوسية التى تتكون عند قواعد الأجزاء النباتية المزروعة. ومن الأهمية بمكان تجديد الزراعة على فترات متقاربة حتى لا ينخفض معدل التضاعف، ويكون من الصعب استمرار النباتات فى النمو عندما تنقل إلى بيئة جديدة. قد يجرى هذا التجديد كل ٢–٤ أسابيع، وأفضل وقت لذلك هو عندما تبدأ النموات فى الزيادة فى الطول

ثالثا المرحلة السابقة للشتل Pretransplanting Stage (أو Stage III)

إن الهدف من هذه المرحلة هو تهيئة النموات المتضاعفة للصلاحية للشتل بتوفير الظروف التى تسمح بتجذيرها فى البيئات، الأمر الذى يتحقق بخفض تركيز السيتوكينين أو حذفه من إضافات البيئة، مع زيادة تركيز الأوكسين، فتلك ظروف تسمح بتكوين جذور جديدة مع استطالة النموات بعد أن كانت الظروف السابقة (التركيز العالى للسيتوكينين) تسمح بتضاعف النموات فقط، تستغرق هذه المرحلة نحو ٢-٤ أسابيع

رابعًا مرحلة الشتلة Transplant Stage (أو Stage IV)

يتضمن هذه المرحلة نقل النبات الصغير من ظروف البيئات المعقمة إلى البيئة العادية فى الصوبات أولا ثم فى مكانه النهائى بعد ذلك تمر النباتات خلال تلك المرحلة بفترة أقلمة acclimation تجعلها قادرة على البقاء عند نقلها إلى الظروف الطبيعية الخارجية وفى بداية هذه المرحلة يُحافظ على نسبة عالية من الرطوبة النسبية حول النباتات، مع حمايتها من كافة الإصابات المرضية والحشرية، ويلى ذلك تعريض النباتات — تدريجيًا — إلى ظروف أقرب إلى الظروف الطبيعية (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣)

ويبين شكل (٦-١) تخطيطًا لمختلف مراحل الإكثار الدقيق

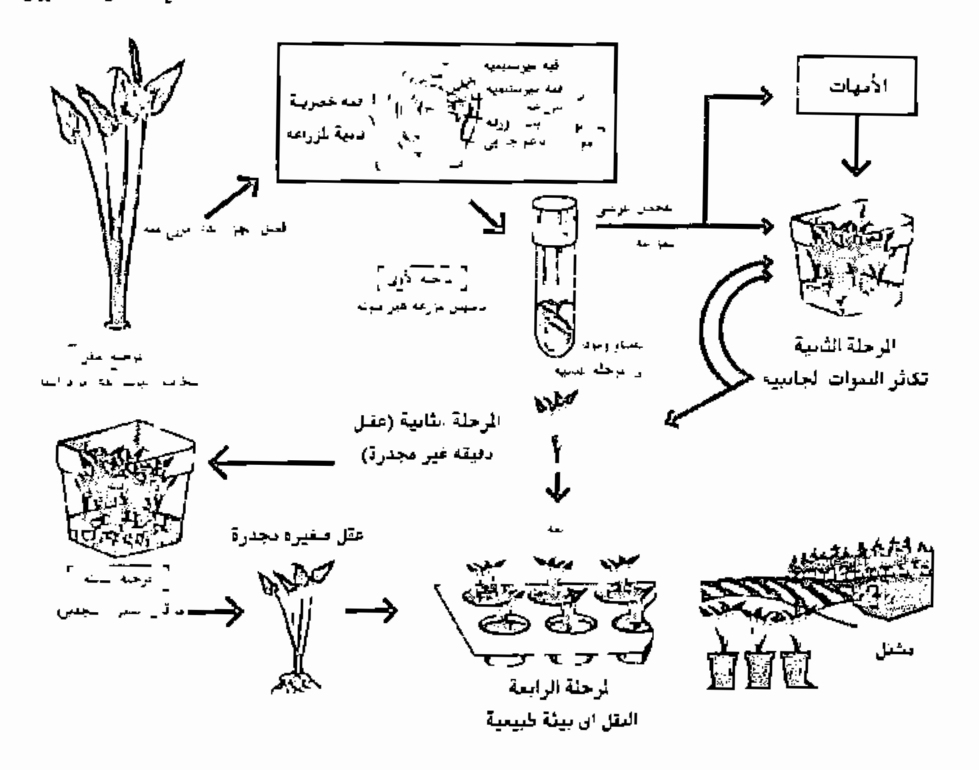
طرق التكاثر وتجديد النمو فى مزارع الإكثار الدقيق

مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية

يحدث التكاثر وتجديد النمو regeneration فى مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية بأحد خمس طرق (يتداخل بعضها معًا)، كما يلى

أولاً من خلال النمو المباشر (من خلال تكاثر البراعم الخضرية وتحفيز النمو الجانبى)

يحدث النمو المباشر بتكاثر الميرستيم المتواجد أصلاً فى الجزء النبـاتى المزروع، كما فى مزارع القمة الميرستيمية، ومزارع القمة النامية الخضرية، ومزارع البراعم الإبطية، ومزارع العقدة المفردة



شكل (٦-١) مراحل الإكثار الدقيق (عن Kane ٢٠٠٥)

يمكن الحصول على الأجزاء النباتية التي تستعمل في التكاثر إما من النباتات النشطة في النمو، وإما من النباتات الساكنة

ولبدء زراعة البراعم تُزال الأوراق المحيطة بالبرعم بعناية، وبعد غسيلها بماء الصنبور، فإن البراعم تغسل بمحلول منظف مخفف جدًا، ثم تعقم في محلول مخفف من كلوريد الزئبقيك أو هيبوكلوريت الصوديوم يحتوى على نقطة من مادة مبللة، مثل توين ٢٠، ثم تغسل عدة مرات بماء معقم قبل نقلها لبيئة الزراعة

ويلي ذلك نقل القمم البرعمية المطهرة سطحيًا إلى بيئة الإكثار، حيث تتكون فيها نموات جديدة عديدة، ويلي ذلك نقلها منفردة إلى بيئة التجذير، وتنقل بعد ذلك النباتات التي يتكون بها مجموعًا جذريًا قويًا إلى حيث تجرى أقلمتها وبتلك الطريقة يمكن زيادة معدل التكاثر من النبات الواحد بنحو ١٠٠٠٠ مرة في المتوسط

يتحقق الإكثار السريع – من خلال النمو المباشر – بإحدى طريقتين تُحفَّز في

أولاهما البراعم الإبطية التى توجد بالجزء النباتى المزروع، وفى آباط النموات الجديدة المتكونة تحفز للنمو إلى فروع جديدة، وذلك بتوفير تركيز عالٍ نسبيًا من سيتوكينين فى بيئة الزراعة. وبعد فترة مناسبة يتم فصل كل نمو جانبى جديد إلى بيئة طازجة جديدة لتكوين مزيد من النموات الجديدة. أما الطريقة الأخرى فإنها تناسب الأنواع التى لا يمكن أن يتحقق فيها التفريع الإبطى السريع، حيث ينمو فيها كل برعم إبطى إلى نمو خضرى واحد، حيث يتم فى هذه الحالة عمل عقل من تلك النموات تحتوى كل منها على عقدة واحدة (nodal segments)، وتزرع فى بيئة جديدة لمزيد من الإكثار

وتجدر الإشارة إلى أن تحفيز النمو لجانبى فى المزارع يتم بتوفير السيتوكينين فيها بتركيز معين، إما مع الأوكسين، وإما بدونه. ويؤدى استمرار توفر السيتوكينين فى المزرعة إلى نمو البراعم الجانبية التى تتكون فى القمة الميرستيمية التى تنمو من البراعم المزروعة (أى من الـ nodal segments)، ثم تنمو البراعم الجانبية التى تتكون فى القمم الميرستيمية الجديدة . وهكذا يؤدى استمرار هذه العملية — لعدة مرات — إلى تكون كتلة من النموات الجديدة.

وعلى الرغم من توقف تكاثر المزرعة الواحدة بهذه الطريقة بعد فترة . إلا أنه يمكن استمرار التكاثر — فى هذه المرحلة — بنقل أجزاء من المزرعة إلى مزارع أخرى جديدة، وبذلك يمكن استمرار التكاثر إلى مالا نهاية، إلى درجة أنه يمكن — على سبيل المثال — إنتاج من ١٥–٢٥ مليون نبات فراولة من نبات واحد فى العام، لأن كل نبات يكون قادرًا على إنتاج ١٠ نباتات جديدة كل أسبوعين.

هذا .. وبينما توجد الجذور — طبيعيًا — فى حالة التميز من الجنين الجنسى الذى يحتوى — بطبيعته — على جذير، فإن عملية التجذير تعد ضرورية فى الحالات التى تنمو فيها النباتات من الأجنة الجسمية. ولإحداث التجذير يلزم نقل النموات المتكونة إلى بيئة أخرى، تختلف فى مكوناتها الهرمونية عن بيئة التكاثر ويكون نقل النموات الخضرية — عادة — إلى هذه البيئات وهى بطول حوالى ١ سم، ثم تنقل النباتات بعد أن تتكون جذورها إلى أصص معقمة بحرص تام، وتتعهد بالرعاية إلى أن تكبر

هذا .. ويندرج تحت النمو المباشر الإكثار الدقيق بتكوين الدرنات فى المزارع كما يلى:

يعد تكوين الدرنات فى المزارع in vitro tuberization إحدى وسائل الإكثار الدقيق، وتجرى تلك الطريقة –فى البطاطس– بزراعة نموات مزارع أنسجة البطاطس الخضرية فى بيئة تحتوى على سيتوكينينات وتعريضها للضوء لمدة ٨ ساعات يوميًا فى حرارة ٢٢°م. وأهم ما يميز تلك الطريقة إمكان إنتاج الدرنات الصغيرة تلك فى أى وقت من العام، مع إمكان شحنها من مكان لآخر بسهولة، وتخزينها لعدة شهور.

ثانيًا: من خلال تكوين البراعم العرضية

بينما تنشأ النموات العادية من الميرستيم القمى أو من البراعم التى توجد فى آباط الأوراق، فإن النمو العرضى ينشأ من براعم عرضية تتكون إما مباشرة على الجزء النباتى المزروع، وإما بطريقة غير مباشرة من الكالوس الذى يتكون على الأجزاء المقطوعة لتلك الأجزاء المزروعة.

ومن بين أنواع الأجزاء النباتية المزروعة التى يتكون منها نموات عرضية، ما يلى:

١ – أجزاء الأوراق.

٢ – الفلقات، والسويقة الجنينية السفلى، وغيرهما من أجزاء البادرة.

٣ – أجزاء من نورات غير مكتملة التكوين وحواملها

٤ – التراكيب الورقية الإبرية كما فى المخروطيات

٥ – أوراق الأبصال، وهى التى تحتوى على حلقات من النسيج الميرستيمى فى قواعدها

٦ – أقراص من النسيج النباتى، مثل تلك التى تؤخذ من درنات البطاطس من نسيج القشرة – حول الأسطوانة الوعائية – وليس من النخاع.

يحدث النمو المباشر بتحول بعض الخلايا البرانشيمية (التى تقع فى البشرة أو تحتها مباشرة فى السيقان) إلى خلايا ميرستيمية، تعرف كل مجموعة منها باسم

meristemoid، وهى البراعم العرضية الحقيقية التى تستمر فى نموها لتعطى النموات الجديدة

أما النمو العرضى المباشر فإنه يتضمن أولاً تكوين كالس على الأجزاء المزروعة فى البيئة، تنمو من حواف هذا الكالوس النموات الجديدة التى لا تكون – فى بادئ الأمر – متصلة بالجهاز الوعائى للجزء النباتى المزروع ويمكن أن تعطى النموات العرضية من هذا الكالس معدلات عالية جدًا من التضاعف، تكون أعلى بكثير من تلك التى تنتج من النموات الجانبية ويقابل ذلك زيادة متوقعة فى نسبة النباتات المخالفة وراثيًا من بين التى تنشأ عرضيًا من الكالس (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣)

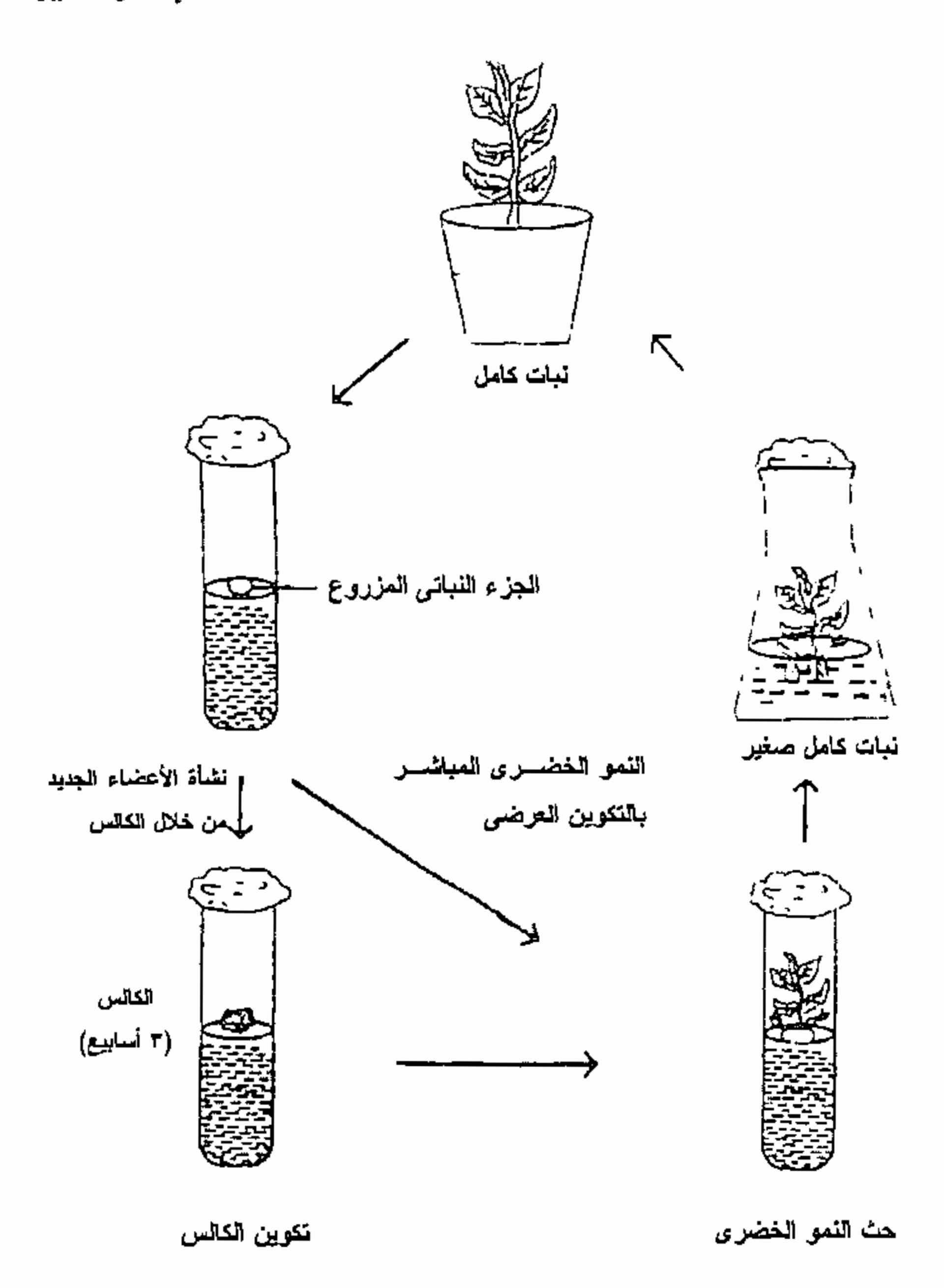
يحدث التميز فى خلايا الكالس إما بتكوين الجذور والنموات الخضرية مباشرة، وإما من خلال هذه الطريقة – وبسبب حالات التضاعف الكروموسومى والتباينات الوراثية التى ترافقها – لم يشع استخدامها سوى فى أنواع نباتية قليلة، مثل الموالح، والنخيل، والبن.

ثالثا. من خلال نشأة أعضاء جديدة

يعرف تجديد النمو الذى يعتمد على ظاهرة نشأة الأعضاء باسم organogensis، حيث تتكون أعضاء جديدة مفردة – مثل الجذور والنموات الخضرية - إما مباشرة من الأنسجة النباتية غير الميرستيمية المنتظمة التكوين (مثل مزارع أنصال الأوراق ومزارع الفلقات إلخ)، وإما بصورة غير مباشرة، تكون – بدورها – إما من الكالس أو الخلايا المفردة التى قد تنتج عن زراعة تلك الأجزاء غير الميرستيمية المنتظمة التكوين، وإما من مزارع الكالس ومزارع الخلايا ذاتها وتعرف الطريقة غير المباشرة لنشأة الأعضاء باسم de novo origin (شكل ٦–٢)

رابعًا. من خلال تكوين الأجنة الجسمية

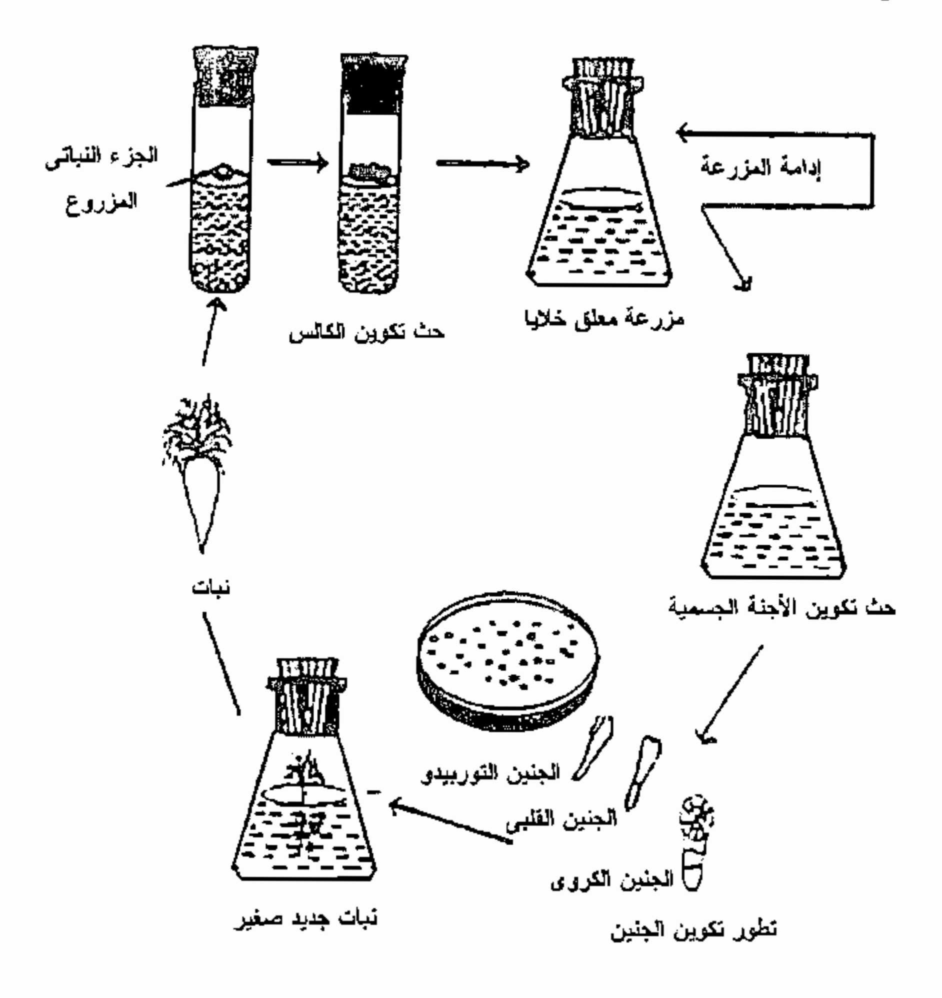
يعرف تجديد النمو الذى يعتمد على ظاهرة نشأة الأجنة الجسمية باسم somatic embryogensis (شكل ٦–٣)، بتكوين تراكيب ثنائية القطب الميرستيمى (bipolar) تعطى نموًا جذريًا وخضريًا معًا، وتعرف هذه الطريقة لنشأة الأجنة الجسمية باسم de novo origin



شكل (٦-٢): تجديد النمو الخضرى عن طريق نشأة أعضاء جديدة **organogensis**.

يمكن أن تنشأ الأجنة الجسمية فى مزارع الأنسجة من أنواع كثيرة من الأجزاء النباتية المستعملة فى الزراعة (explants)، مثل الأوراق، والأجزاء الزهرية، والنورات،

والمتوك، والأجنة غير المكتملة التكوين، والنيوسيلة .. إلخ وتمر الأجنة الجسمية بذات المراحل التى تمر بها الأجنة الجنسية، وهى مراحل التكوين الكروى globular، والقلبى التشكل heart-shaped، والتوربيدو torpedo، والفلقى cotyledonory فى ذوات الفلقتين، والكروى، والصفيحى أو الحرشفى scutellar، والغمدى coleoptilar فى ذوات الفلقة الواحدة



شكل (٦-٣) تجديد النمو عن طريق نشأة أجنة جسمية embryogensis فى الجزر

هذا .. وتتكون الأجنة الجسمية إما مباشرة دون المرور بمرحلة نمو كالوسى، وإما بطريقة غير مباشرة من خلال الكالس وفى كلتا الحالتين يمر تكوين الجنين الجسمى

بمرحلتين، حيث يستحث أولاً على تكوين خلايا ذات قدرة جنينية تنافسية (تعرف باسم proembryonic cell masses، أو clumps، أو proembryos) في وجود تركيز عال من الأوكسين، ويلي ذلك تطور الكتل الجنينية (أو الـ proembryos) إلى أجنة في غياب الأوكسينات أو في وجود تركيز منخفض منها (عن Kaur وآخرين ٢٠٠٠).

وقد أمكن إنتاج أجنة جسمية من أنواع مختلفة من المزارع لعدة أنواع محصولية، ومن أمثلتها ما يلي:

المحصول		العضو أو النسيج النباتي المستخدم كمصدر للجنين الجسمي
الشيف	*Allium schoenoprasum*	النواتان المساعدتان في الكيس الجنيني
الرجلة	*Portulaca oleracea*	الإندوسبرم
الفراولة البرية	*Fragaria vesca*	النواتان المساعدتان
الفلفل من النوع	*Capsicum frutescens*	الجنين
الفلفل	*C. annuum*	التوك
الهندباء	*Cichorium endivia*	الجنين
الكوسة	*Cucurbita pepo*	السويقة الجنينية العليا – الفلقات
الأسبرجس	*Asparagus officinalis*	السويقة الجنينية العليا – الأوراق – التوك – الساق – الجنين – البروتوبلازم – الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة
الطماطم	*Lycopersicon esculentum*	الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة
الطماطم البرية	*L. pimpinellifolium*	الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة
الجزر	*Daucus carota*	الجنين – نسيج الكالس – السويقة الجنينية العليا – الأوراق – أعناق الأوراق – اللحاء – البروتوبلازم – الجذور – السيقان
الفينوكيا	*Foeniculum vulgare*	الساق – الجنين

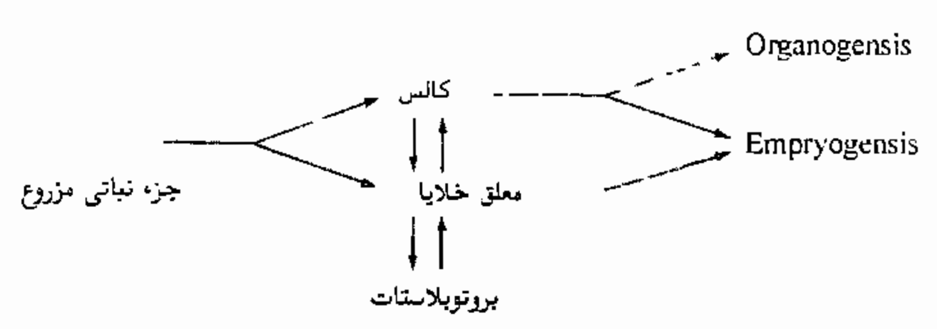
ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Tisserat وآخرون (١٩٧٩).

مزارع الكالس والخلايا والبروتوبلاست

إن زراعة الخلايا النباتية – إما على صورة نسيج كالس، وإما على صورة معلقات من الخلايا أو البروتوبلاستات – يوفر وسيلة هامة – قد تكون أساسية – لتجديد نمو نباتات كاملة، ولكن بسبب كثرة التباينات الوراثية التى تصاحب تلك النوعية من المزارع فإنها لا تستخدم كثيرا في إكثار الأصناف، وإن كانت تستعمل فى الدراسات الوراثية، والتربية، والهندسة الوراثية وعلى الرغم من ذلك فهى تقدم وسيلة فعالة لتكوين الأجنة الجسمية بأعداد هائلة، وهى التى يمكن زراعتها حقليًا وهى محمولة فى السوائل (fluid drilling)

يبدأ حث تكوين الجذور والسيقان ومبادئ الأجنة proenbryoids بإعادة تميز مجموعات من الخلايا البرانشيمية مكونة مراكز للنشاط الميرستيمى، وقد أطلق عليها اسم meristemoids فى حالة الـ organogensis، و preembryonic masses فى حالة الـ embryogensis ويتوقف حدوث الـ organogensis أو الـ embryogensis على الجزء النباتى المزروع. ولكن الاتجاه قد يمكن التحكم فيه بالتحكم فى مكونات بيئة الزراعة (شكل ٦–٤)

كذلك تنتج الأجنة الجسمية إما مباشرة (مثلما يكون عليه الحال عند استعمال النسيج النيوسيلى لأصناف الموالح ذات البذور متعددة الأجنة، وبويضات العنب، وأجنة الكاكاو غير المكتملة التكوين)، وإما بصورة غير مباشرة من خلال نسيج الكالس أو مزارع الخلايا المعلقة وتنشأ الأجنة الجسمية من خلايا أحادية تقع داخل عناقيد من الخلايا الميرستيمية فى الكالس أو فى المعلق



شكل (٦–٤) تخطيط لمراحل الـ **organogensis** والـ **embryogensis** فى مزارع الكالس والخلايا والبروتوبلاست.

ونظرًا لسبق مناقشة موضوع مزارع البروتوبلاست بالتفصيل فى الفصل الرابع من هذا الكتاب، فإننا نقصر المناقشة على كل من مزارع الخلايا ومزارع الكالس فقط.

مزارع الكالس

ينتج الكالس على الأجزاء النباتية المزروعة فى البيئات الصناعية نتيجة للجروح التى تحدث فيها، وذلك استجابة للهرمونات التى قد تتواجد طبيعيًّا فى تلك الأجزاء المزروعة أو تزود بها بيئة الزراعة. هذا ويمكن فصل أى جزء نباتى (بذور أو سيقان أو جذور أو أوراق أو أعضاء تخزين أو ثمار) وتطهيره، وزراعته على سطح بيئة زراعة لإنتاج الكالس ويمكن استمرار إعادة زراعة أنسجة الكالس عدة مرات ولفترات طويلة بعيدا عن الجزء النباتى الأصلى المزروع

وأفضل البيئات وأكثرها استعمالاً فى إنتاج الكالس هى بيئة موراشيج وسكوج.

وعلى الرغم من أن نسيج الكالس المتكون فى البيئات يبدو لأول وهلة كأنه نسيج متجانس من الخلايا، إلا أنه فى حقيقة الأمر نسيج معقد يحتوى على تباينات كثيرة مورفولوجية، وفسيولوجية، ووراثية

يكون نمو الكالس لوغاريتميًّا، حيث يمر بالمراحل التالية:

١ – فترة أولية من الانقسام الخلوى البطئ .. وهى فترة الحث induction period، وهى تتطلب تواجد الأوكسين.

٢ – فترة من الانقسام الخلوى السريع، مع التمثيل النشط لكل من الدنا والرنا والبروتين

٣ – فترة يتوقف فيها انقسام الخلايا، وتتميز فيها خلايا الكالس المتكونة إلى خلايا برانشيمية أكبر حجمًا وخلايا أخرى من طراز الخلايا الوعائية.

هذا .. ولا يحدث الانقسام الخلوى فى كل الكتلة الكالوسية، ولكنه يقع أساسًا فى طبقة ميرستيمية عند الحافة الخارجية لكتلة الخلايا. أما الأجزاء الداخلية للكالس فإنها تبقى ككتلة غير منقسمة من النسيج، وبمرور الوقت .. فإنها قد تتميز فسيولوجيًّا ووراثيًّا

عن خلايا الطبقة الخارجية. يقل الانقسام فى خلايا الطبقة الخارجية للكالس بعد فترة، وتظهر فيه عقد knobs (يصبح knobby) بعدما يصبح الانقسام محصورا فى أماكن منفصلة منه، هى التى تظهر فيها تلك العقد ويعنى ذلك أن خلايا الكالس تتباين فى أعمارها، حيث تكون الخلايا الوسطية أكبر عمرًا، بينما تكون خلايا الحافة ميرستيمية وأصغر عمرًا

مزارع معلقات الخلايا

تعد مزارع معلقات الخلايا cell suspension culture امتدادًا لمزارع الأنسجة أو مزارع الكالس، حيث إنها تتكون من خلايا أو مجموعات منها منتشرة ونامية فى بيئة مغذية سائلة.

تتميز مزارع الخلايا عن مزارع الكالس فى أن الخلايا تكون — غالبا — مفردة، وتكون كل منها على اتصال مباشر بالبيئة، وتقل فيها كثيرًا ظهور التباينات الوراثية، مقارنة بمزارع الكالس

تبدأ مزرعة معلقات الخلايا بوضع قطعة من الكالس المفككة أو نسيج مجنس homogenized فى بيئة سائلة، بحيث تنفصل فيها الخلايا عن بعضها البعض. وقد توضع المزرعة فى دوراق على جهاز هزاز دوّار للسماح باختلاط الهواء مع البيئة السائلة، أو فيما يعرف باسم turbidostat الذى يحافظ على دوران البيئة داخل الدورق المخروطى بصورة دائمة. وفى طريقة ثالثة توضع الخلايا على ورقة ترشيح توضع بدورها على سطح بيئة سائلة توجد فى طبق بترى دونما حاجة إلى إحداث أى اهتزازات

يمر انقسام الخلايا بالمراحل التالية:

١ — فترة من الانقسام البطئ lag phase.

٢ — فترة من الانقسام السريع اللوغاريتمى exponential growth.

٣ — فترة من الانقسام الثابت linear growth.

٤ — فترة من التدهور فى الانقسام وفى أعداد الخلايا الحية deceleration phase

٥ — فترة نهائية من الثبات فى أعداد الخلايا stationary state

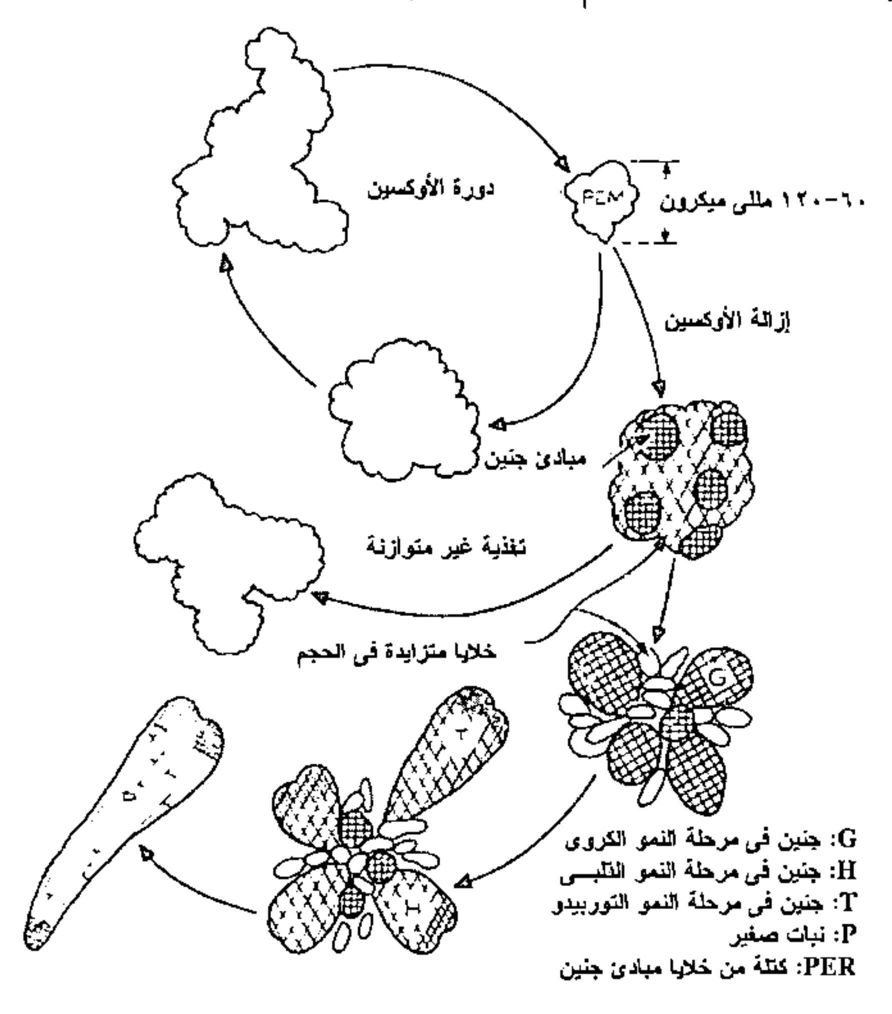
ويعرف منحنى النمو هذا بالمنحنى اللوغاريتمى، وهو يتكرر إذا ما جددت زراعة نفس الخلايا فى بيئة جديدة، ويمكن أن يستمر ذلك إلى مالا نهاية باستمرار إعادة الزراعة (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).

تتكون الأجنة الجسمية Somatic Embryos، أو Embryoides فى مزارع الخلايا عندما تتوفر لها شروط معينة، تتعلق بمنظمات النمو (خاصة الأوكسينات والسيتوكينينات)، مع توفر مصدر للنيتروجين، وبعض العوامل الأخرى؛ ففى مزارع خلايا الجزر (شكل ٦–٥) يتكون الكالس عندما تكون البيئة غنية بالأوكسين (يستعمل عادة الأوكسين ٢، ٤–د بتركيز ٠,٥–١,٠ جزءًا فى المليون)؛ وإذا نقلت تجمعات من هذه الخلايا الميرستيمية إلى بيئة ذات محتوى شديد الانخفاض من الأوكسين (حوالى ٠١ ٠–٠,١ جزءًا فى المليون)، أو خالية تمامًا منه .. فإنه تتميز فيها أجنة كاملة.

ويبدو أن وجود الأوكسين فى البيئة الأولى ضرورى لتكوين الأجنة فى البيئة الثانية؛ لأن الأنسجة التى تبقى دائمًا فى بيئة خالية من الأوكسين لا تتكون بها أجنة. أما مصدر النيتروجين فى البيئة .. فيفضل أن يكون على صورة مختزلة؛ مثل كلوريد الأمونيوم NH_4Cl منفردة، أو مع نترات البوتاسيوم KNO_3 ومرد ذلك أن تكوين الأجنة يتطلب حدًا أدنى من أيون الأمونيا NH_4^+ داخل الخلايا؛ وهو ما لا يتحقق إلاّ إذا توفر أيون الأمونيا بتركيز منخفض (٢,٥ مللى مول/لتر)، أو أيون النترات NO_3^- بتركيز مرتفع (٦٠ مللى مول/لتر) فى البيئة. ومن الشروط الأخرى الضرورية لتميز الأجنة توفر تركيز عالٍ من البوتاسيوم (٢٠ مللى مول/لتر) فى البيئة، وألا يزيد تركيز الأكسين الذائب عن ١,٥ مجم/لتر؛ لأن التركيز الأعلى من ذلك يشجع على تكوين الجذور.

وتجدر الإشارة إلى أن الأجنة المتكونة فى مزارع الخلايا تبقى على اتصال سيتوبلازمى مع الخلايا المجاورة لها فى البيئة خلال المراحل الأولى لتكوين الأجنة، ولا تنفصل عنها إلا فى مراحل متأخرة حينما يصبح الجنين مكونًا من عدة خلايا. وتكمل الأجنة نموها وتنبت مباشرة فى نفس البيئة، إلا أن الأنواع – التى تحتاج بذورها إلى المعاملة بالبرودة لكى تنبت – تتطلب نفس المعاملة؛ حتى تنبت أجنتها الجسمية المتكونة فى البيئات. هذا .. ويطلق على القدرة الموروثة فى الخلايا النباتية

لإنتاج نباتات كاملة — حتى بعد أن تكون هـذه الخلايـا قـد تميـزت نهائيًا فـى جسـم النبات الذى أخذت منه — اسم Totipotency (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



شكل (٦–٥). تخطيط يبين مراحل تكوين الأجنة الجسمية فى مـزارع الخلايـا المعلقـة للجـزر (Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

بيئات الزراعة المستخدمة فى الإكثار الدقيق

تتنوع بيئات الزراعة المستخدمة فى الإكثار الدقيق لمختلف الأنـواع النباتيـة، ولكنهـا تعد — بصورة عامة — تباينات من بيئة موراشيج وسكوج.

وتستخدم فى كثير من الأنواع النباتية ثلاثة أنواع من البيئات لأجل الإكثار الدقيق من خلال التوالد الجنينى embryogensis، تكون الأولى منها لأجل تكوين الكالس واستمراريته، والثانية لأجل تكوين الأجنة الجسمية، والثالثة لأجل السماح لتلك الأجنة بالنمو إلى نباتات كاملة.

يعد تواجد الأوكسين فى البيئة ضروريًّا لبدء تكوين الأجنة، وإذا ما استمر تعرض الأنسجة أو الكالس لبيئة خالية من الأوكسين، فإنه لا تنتج أجنة. يعمل الأوكسين على حث تميز مجموعات من الخلايا الميرستيمة تعرف باسم التجمعات الجنينة embryogenic culumps. وتتطور تلك التجمعات من الخلايا الميرستيمية إلى أجنة مكتملة التكوين لدى نقلها إلى بيئة خالية من الأوكسين، أو ذات تركيز منخفض منه (عن Chawla ٢٠٠٠).

ويبين جدول (٦-١) تركيب المحاليل القياسية المستخدمة فى تحضير بعض بيئات الإكثار الدقيق، كما يبين جدولا (٦-٢)، و (٦-٣) تركيب بيئات الإكثار الدقيق لكل من نخيل التمر، والفراولة على التوالى — كمثالين — علمًا بأن البيئات المناسبة تختلف كثيرًا من نبات إلى آخر.

ولقد كانت أفضل بيئة للإكثار المبدئى من عيون درنات البطاطس (صنف كارا) هى بيئة موراشيج وسكوج المزودة بالسيتوكينين بنزيل أمينوبيورين BAP، والأوكسين نفثالين أسيتك آسيد NAA بتركيز ٢ مجم/لتر، و ٠,٥ مجم/لتر لكل منهما على التوالى، حيث بلغ متوسط عدد العقد المنتجة لكل تكوين نباتى كامل نما على هذه البيئة بعد زراعة العيون ٦,٧ عقدة.

وقد أكثرت السيقان ذات الأوراق الصغيرة الناشئة بإعادة زراعتها خمس مرات متتالية على بيئة إكثار تتكون من بيئة موراشيج وسكوج المزودة بالسيتوكينين BAP، والأوكسين NAA، وحامض الجبريلليك GA_3، وبانتوثينات الكالسيوم calcium pantothenate بتركيز ٢,٠، و ٠,٥، و ٠,٠١، و ٢,٠ مجم/لتر، على التوالى، علمًا بأن معدل تضاعف السيقان ذات الأوراق الصغيرة لم يتأثر سلبيًّا خلال خمس مرات من التقسيم وإعادة الزراعة.

كذلك أمكن تجذير السيقان الصغيرة المتكونة — التى احتوت كل منها على ثلاث

عقد – على بيئة موارشيج وسكوج المزودة بالأوكسين 2,4-D بتركيز ٢ مجم/لتر أو المزودة بالسكروز بتركيز ٨٪. وعقب التجذير نقلت النباتات الجديدة بنجاح إلى خارج المعمل

جدول (٦–١): المحاليل القياسية المستخدمة في تحضير بعض بيئات الإكثار الدقيق[أ] (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).

مجموعة المحاليل	المركب	Murashige and Skoog (MS)	Woody Plant Medium (WPM)	Anderson (AND)	Gamborg B5
A	NH_4NO_3	١٦٥,٠٠ جم/لتر	٤٠,٠٠ جم/لتر	٤٠,٠٠ جم/لتر	—
	KNO_3	١٩٠,٠٠ جم/لتر	—	٤٨,٠٠ جم/لتر	٢٥٠,٠٠ جم/لتر
	$Ca(NO_3.4H_2O)$	—	٥٥,٦ جم/لتر	—	—
B	K_2SO_4	—	٩٩,٠٠ جم/لتر	—	—
	$MgSO_4.7H_2O$	٣٧,٠٠ جم/لتر	٣٧,٠٠ جم/لتر	٣٧,٠٠ جم/لتر	٢٥,٠٠ جم/لتر
	$MnSO_4.H_2O$	١,٦٩ جم/لتر	٢,٢٣ جم/لتر	١,٦٩ جم/لتر	١,٠٠ جم/لتر
	$ZnSO_4.7H_2O$	٠,٨٦ جم/لتر	٠,٨٦ جم/لتر	٠,٨٦ جم/لتر	٠,٢ جم/لتر
	$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٠٢٥ جم/لتر	٠,٠٠٢٥ جم/لتر	—	٠,٠٠٢٥ جم/لتر
	NH_4SO_4	—	—	—	١٣,٤ جم/لتر
C	$CaCl_2.2H_2O$	٤٤,٠٠ جم/لتر	٩,٦ جم/لتر	٤٤,٠ جم/لتر	١٥.٠٠ جم/لتر
	KI	٠,٠٨٣ جم/لتر	—	٠,٠٨٣ جم/لتر	٠,٠٧٥ جم/لتر
	$CoCl_2.6H_2O$	٠,٠٠٢٥ جم/لتر	—	٠,٠٨٣ جم/لتر	٠,٠٠٢٥ جم/لتر
D	KH_2PO_4	١٧,٠٠ جم/لتر	١٧,٠٠ جم/لتر	—	—
	H_3BO_3	٠,٦٢ جم/لتر	٠,٦٢ جم/لتر	٠,٦٢ جم/لتر	٠,٣٠ جم/لتر
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠,٠٢٥ جم/لتر	٠,٠٢٥ جم/لتر	٠,٠٢٥ جم/لتر	٠,٠٢٥ جم/لتر
	$NaH_2PO_4.H_2O$	ب	—	٣٨,٠٠ جم/لتر	١٥,٠٠ جم/لتر
E	$FeSO_4.7H_2O$	٢,٧٨٤ جم/لتر	٢,٧٨ جم/لتر	٥,٥٧ جم/لتر	٢,٧٨ جم/لتر
	$Na_2.EDTA$	٣,٧٢٤ جم/لتر	٣,٧٣ جم/لتر	٧,٤٥ جم/لتر	٣,٧٢٥ جم/لتر
F	Thiamin.HCl	٠,١٠ جم/لتر	٠,١٠ جم/لتر	٠,٠٤ جم/لتر	١,٠٠ جم/لتر
	Nicotinic acid	٠,٠٥ جم/لتر	٠,٠٥ جم/لتر	—	٠,١٠ جم/لتر
	Pyridoxine.HCl	٠,٠٥ جم/لتر	٠,٠٥ جم/لتر	—	٠,١٠ جم/لتر
	Glycine	٠,٢٠ جم/لتر	٠,٢٠ جم/لتر	—	—
G	Myo-inositol	١٠,٠٠ جم/لتر	١٠,٠ جم/لتر	١٠,٠٠ جم/لتر جـ	١٠,٠٠ جم/لتر

أ – تبلغ قوة هذه المحاليل مائة ضعف التركيز النهائي المطلوب من كل منها. يستخدم ١٠ مل من كل محلول قياسي في تحضير لتر واحد من بيئة الزراعة.

ب – تُزود بها بيئة الزراعة – عادة – بمعدل ٨٥–٢٢٥ مجم/لتر

جـ – يضاف – كذلك – كبريتات الأدنين بمعدل ٨٠ مجم/لتر.

جدول (٦-٢): بيئات الإكثار الدقيق لنخيل التمر.

المكونات	البيئـــة (مجم/لتر) من خلال الكالس	البيئـــة (مجم/لتر) من خلال الأجنة
مركبات غير عضوية		
NH_4NO_3	١٦٥٠	١٦٥٠
KNO_3	١٩٠٠	١٩٠٠
$CaCl_2$	٣٢٢	٣٢٢
$MgSO_4.7H_2O$	١٨١	١٨١
KH_2PO_4	١٧٠	١٧٠
$NaH_2PO_4.2H_2O$	١٧٠	١٧٠
KI	٠,٨٣	٠,٨٣
H_3BO_3	٦,٢	٦,٢
$MnSO_4.H_2O$	١٦,٩	١٦,٩
$ZnSO_4.H_2O$	٨,٦	٨,٦
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠,٢٥	٠,٢٥
$CuSO_4$	٠,٠١٦	٠,٠١٦
$CoCl_2.6H_2O$	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥
FeNa.EDTA	٣٦,٧	٣٦,٧
مركبات عضوية		
Inositol	١٠٠	١٠٠
Thiamine HCl	٠,٤	٠,٤
منظمات نمو		
2,4-D	١٠٠	—
2-ip	٣	—
فحم مُنَشطَ neutralized charcoal	٣٠٠٠	٣٠٠٠
آجار	٪٠,٨	٪٠,٨
سكروز	٪٣	٪٣

وقد أدت زيادة تركيز السكروز إلى ٨٪ فى بيئة موراشيج وسكوج – وبدون هرمونات – إلى تحفيز تكوين الدرنات معنويًا وزيادة أعدادها وأحجامها. وبينما قللت الفترة الضوئية القصيرة (٨ ساعات) النمو الخضرى مقارنة بالفترة الطويلة (١٦ ساعة) .. فإن الفترة الضوئية لم يكن لها تأثير معنوى على عدد الدرنات المنتخبة لكل ساق ورقية زرعت معمليًا، إلاّ أنها أثرت فقط على وزن تلك الدرنات. وقد أمكن تنبيت الدرنات الصغيرة بسهولة، حيث أعطت نباتات ذات صفات مطابقة للصنف المستخدم (& Ebida El-Gamal ١٩٩٢).

جدول (٦–٣): بيئات الإكثار الدقيق للفراولة.

المكونات	البيئات (مجم/لتر) التجذير	التكاثر	التهيئة
مركبات غير عضوية			
KNO_3	٢٥٠	٢٥٠	٢٥٠
$MgSO_4.7H_2O$	٢٥٠	٢٥٠	٢٥٠
KH_2PO_4	٢٥٠	٢٥٠	٢٥٠
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	١٠٠٠	١٠٠٠	١٠٠٠
KI	٠,٨٣	٠,٨٣	٠,٨٣
H_3BO_3	٦,٢	٦,٢	٦,٢
$MnSO_4.4H_2O$	١٦,٩	١٦,٩	١٦,٩
$ZnSO_4.7H_2O$	٨,٦	٨,٦	٨,٦
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠,٢٥	٠,٢٥	٠,٢٥
$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥
$CoCl_2.6H_2O$	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥
$FeSO_4.7H_2O$	٢٧,٨	٢٧,٨	٢٧,٨
$Na_2.EDTA$	٣٧,٣	٣٧,٣	٣٧,٣
مركبات عضوية			
Inositol	١٠٠	١٠٠	١٠٠
Nicotinic acid	٠,٥	٠,٥	٠,٥
Pyridoxine HCl	٠,٥	٠,٥	٠,٥
Thiamine HCl	٠,١	٠,١	٠,١
Glycine	٢	٢	٢
منظمات نمو			
BAP	٠,١	١	—
IBA	١	١	١
GA_3	٠,١	٠,١	—
جلوكوز	٤٪	٤٪	٤٪
آجار	٠,٨٪	٠,٨٪	٠,٨٪

كذلك أمكن إكثار صنف البطاطس رصِّت بيربانك باستعمال أقراص من النموات الجديدة المتبرعمة بالدرنات وزراعتها – بعد تطهيرها سطحيًا – في بيئة الإكثار،

حيث كونت سيقانًا خضرية صغيرة فى خلال ٢٠ يومًا، ثم أكثرت تلك النموات باستعمال العقل الورقية nodal cuttings وبعد تجذير تلك النموات الجديدة أمكن زراعتها خارج المعمل بنجاح. وفى الوقت ذاته أمكن تكوين درنات صغيرة بمعدل ثلاث درنات صغيرة بكل نبات مزروع explant يحتوى على ثلاث عقد فى بيئة موراشيج وسكوج المزودة بالكينتين والأنسيميدول ancymidol بتركيز ٧,٥، و ١٠,٠ مجم/لتر، على التوالى، وذلك فى خلال خمسة أيام من زراعتها (Ebida & Hu ١٩٩٣).

مزارع القمة الخضرية

الجزء النباتى المستخدم فى الزراعة

يكون الجزء النباتى المستخدم فى الإكثار الدقيق فى مزارع القمة الخضرية إما كل النمو القمى أو بعضه (شكل ٦-٦)، وإما النمو الجانبى على ساق (شكل ٦-٧)، وإما قطعة من ساق النبات تحتوى على عدة عقد (شكل ٦-٨أ)؛ أى إن حجم الجزء النباتى المزروع يتباين كثيرًا.

وأكثر الأجزاء النباتية استعمالاً هى القمة الخضرية المندمجة التى يتراوح طولها بين ٥٠ إلى ٢٠ سم (شكل ٦-٩). ومن الطبيعى أن هذا الحجم أسهل فى تداوله، ولكنه قد لا يكون خاليًا من الإصابات الفيروسية.

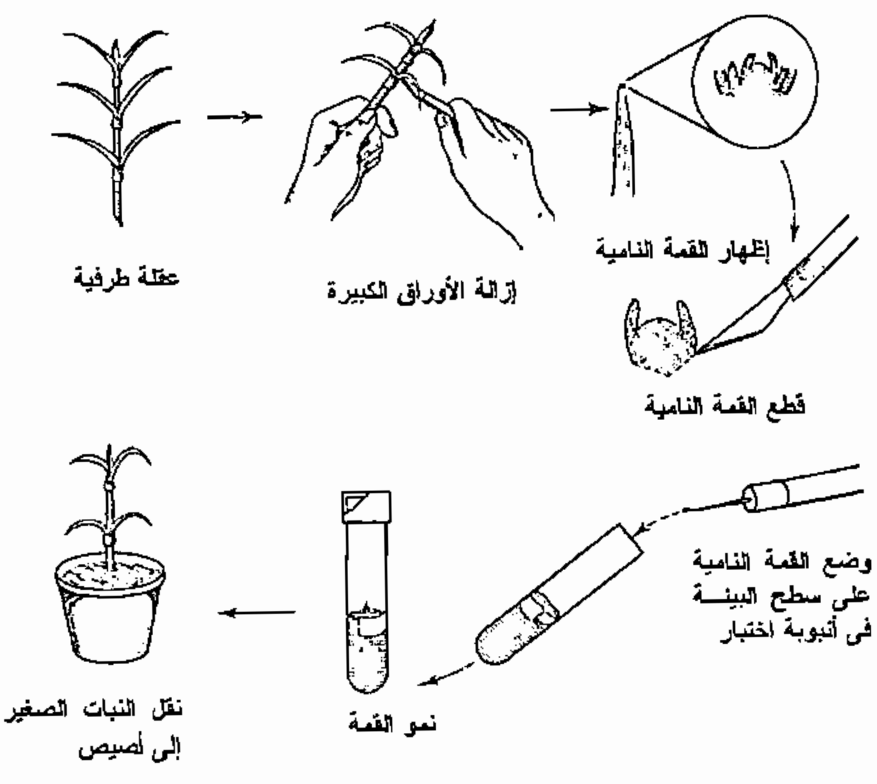
وفى نظام آخر للإكثار الدقيق تستعمل أجزاء بطول ١-٢ سم - أو أطول من ذلك - من قمة خضرية نامية وغير مكتملة التكوين، وتحتوى على أوراق غير مكتملة التكوين. وتلك الأجزاء تكون أسهل فى تداولها، ولكنها غالبًا ما تكون ملوثة بمسببات الأمراض أو مصابة بالفيروسات.

وقد تؤخذ - كذلك - أجزاء نباتية مماثلة - لزراعتها - من نموات البراعم الجانبية - تكون بمثابة عقلاً وحيدة العقدة (شكل ٦-٧، و ٦-٨ب).

تتوطد زراعة القمة الخضرية من خلال استطالة الميرستيم القمى وما يصاحب ذلك من نمو محدود للميرستيمات الإبطية. أما مرحلة التضاعف فإنها تحدث عند توقف

الميرستيم القمى وتحفيز نمو البراعم الإبطية واستطالتها ويؤدى التجديد المستمر للمزارع وفصل النموات الجديدة وزراعتها فى بيئات جديدة إلى إحداث تضاعف كبير فى النمو، ولكن يبقى مدى ذلك التضاعف رهنًا على عدد البراعم الإبطية فى الجزء النباتى المزروع.

وكذلك فإن إنتاج النموات الجانبية قد يتحقق من خلال التكوين الغزير لبراعم إبطية من الكالس فى قاعدة الجزء النباتى المزروع (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).



شكل (٦-٦) مزارع القمة الخضرية فى القرنفل.

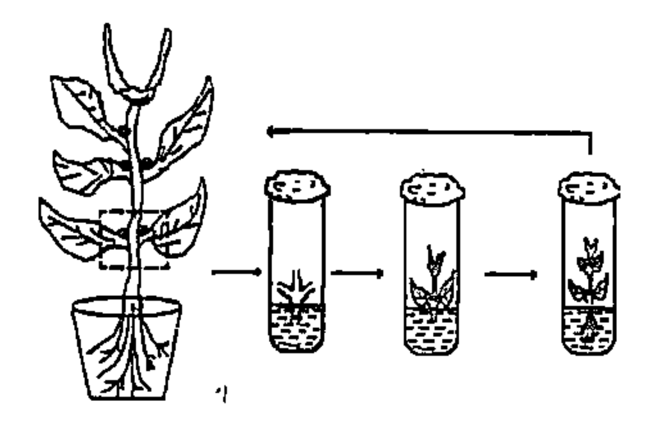
الإكثار الدقيق للأنواع الخشبية

يُراعى فى عملية الإكثار الدقيق للأنواع الخشبية ما يلى:

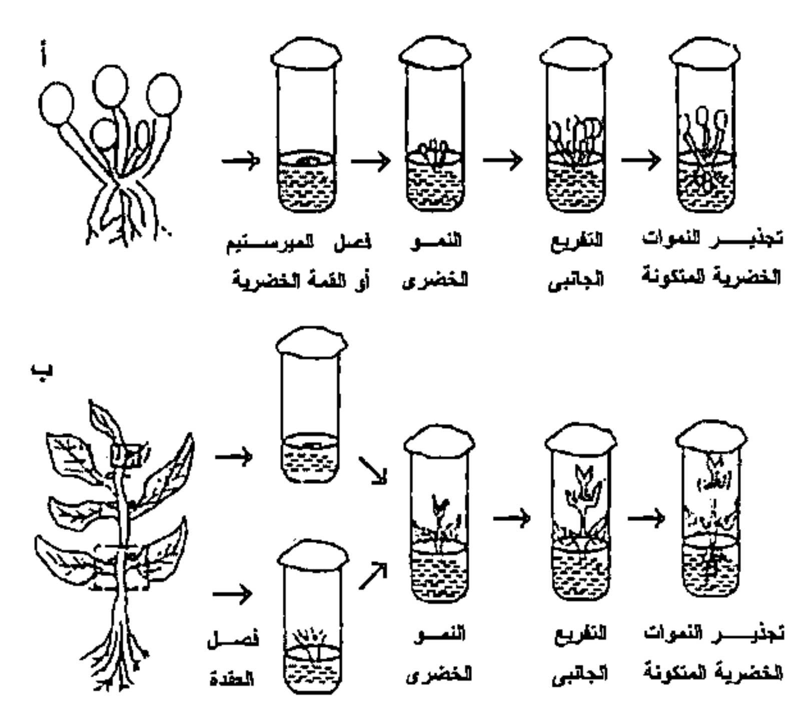
١ — الجزء النباتى المزروع:

ما لم يكن الهدف من الإكثار الدقيق هو التخلص من الفيرس، فإنه يكون من المفضل

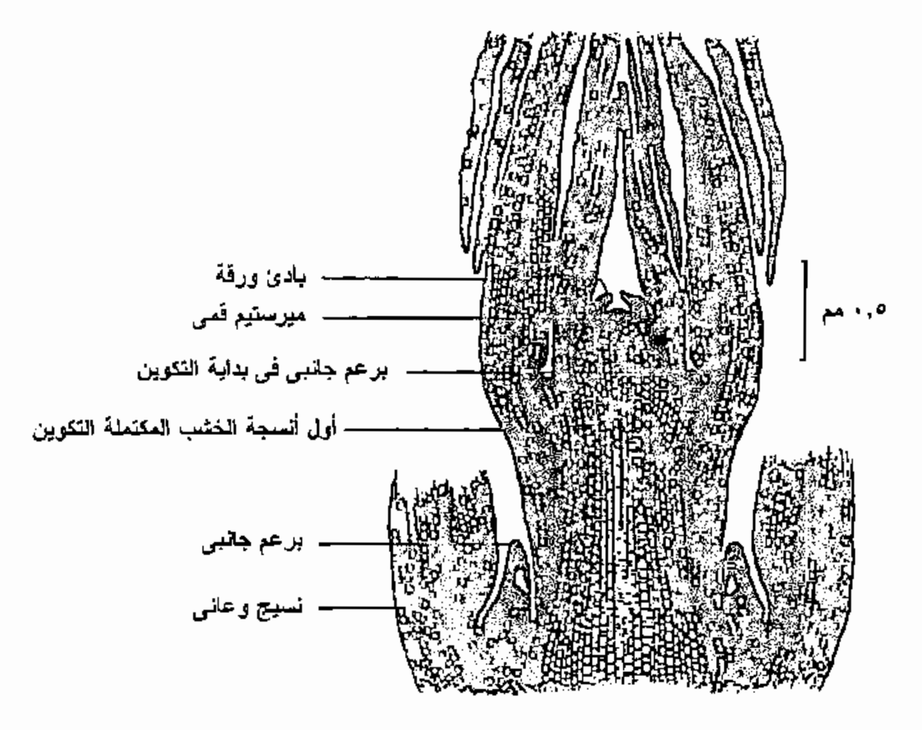
بدء المزارع من عقد ساقية؛ ذلك لأن البراعم أو القمم الميرستيمية المفصولة من النباتات البالغة قد تموت، وقد لا تعطى نتائج جيدة. أما عند استعمال العقد الساقية فإن النسيج الأمى للعقل الصغيرة المزروعة يلعب دورًا هامًا فى بقاء ونمو البراعم.



شكل (٦-٧): مزرعة إكثار دقيق تعتمد على استخدام العقدة المفردة.



شكل (٦-٨): مزرعة إكثار دقيق تعتمد على استخدام البراعم الإبطية: (أ) فى حالة النباتات ذات النمو المتورد rosette، (ب) وفى حالة النباتات ذات السيقان الطويلة elongate



شكل (٦-٩) القمة الخضرية النباتية

٢ التلون البنى للبيئة

يعتبر تأكسد المواد الفينولية التى تتسرب من السطح المقطوع للأجزاء النباتية المزروعة التى تؤخذ من الأنسجة المكتملة النمو للأنواع الخشبية — وبعض الأنواع الأخرى كذلك — يعتبر أحيانا مشكلة خطيرة، حيث تغير أكسدة الفينولات لون البيئة إلى البنى القاتم نسبيّ، كما تصبح سامة للأنسجة وتؤدى سرعة نقل الأجزاء النباتية المزروعة إلى بيئة جديدة مرتين أو ثلاث مرات على فترات قصيرة (أيام قليلة) إلى الحد من تلك المشكلة أحيانًا، حيث يلتئم خلال تلك الفترة السطح المقطوع للجزء النباتى المزروع، ويتوقف التسرب منه

وإذا ما استمرت مشكلة التلون البنى فى كل مرة تعاد فيها الزراعة فإنه يوصى بإضافة أحد مضادات الأكسدة إلى بيئة الزراعة، مثل الـ cysteine-HCl (بتركيز ١٠٠ مجم لتر)، وحامض الأسكوربيك (بتركيز ٥٠-١٠٠ مجم/لتر)، وحامض الستريك (بتركيز ١٥٠ مجم/لتر) كذلك وجد أنه بإضافة البولى فينيل بيروليدون -polyvinyl

pyrrolidone — الذى يقوم بامتصاص المركبات الفينولية — فإنه يمكن إنقاذ النسيج النباتى المزروع من التأثير السام للفينولات المؤكسدة. هذا .. مع العلم بأن إبقاء المزارع فى الظلام فى بداية الزراعة يحد من مشكلة التلون البنى لأن الضوء يساعد فى تحفيز أكسدة الفينولات.

٣ — دور الفلوروجلوكينول:

يلعب الفلوروجلوكينول phloroglucinol — وهو مركب فينولى يوجد فى عصارة الخشب بالتفاح — يلعب دورًا فى تضاعف السيقان وتجذير عدد من الأنواع النباتية بالعائلة الوردية (Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

التطعيم الدقيق للقمة الخضرية

يُعَرَّف التطعيم الدقيق micrografting بأنه تطعيم قمة نامية من النبات الأم على نبات صغير نامٍ فى صوبة أو فى مشتل، أو على بادرة نباتية أنتجت فى ظروف معقمة — وذلك بعد إزالة قمتها — أو على عقلة دقيقة حُصِل عليها من التكاثر الدقيق فى مزارع الأنسجة.

ومن أهم مزايا التطعيم الدقيق للمربى، ما يلى:

١ — التخلص من الفيروسات، عندما يكون من الصعب تجديد نمو سيقان وجذور من القمة الخضرية للنباتات الخشبية فى مزارع الأنسجة.

٢ — تخطى مرحلة الحداثة التى ترتبط بالإكثار البذرى فى النباتات الخشبية (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

ولقد نجحت طريقة التطعيم الدقيق فى كل من الموالح، والتفاح والفاكهة ذات النواة الحجرية.

وفى الموالح .. نجحت هذه الطريقة فى إنتاج نباتات فى مرحلة النمو البالغ adult stage مباشرة دون المرور بمرحلة الحداثة القوية التى تمر بها البادرات التى تنتج من الأجنة النيوسيلية، وهى الطريقة التى تستعمل — كذلك — فى إنتاج نباتات خالية من الإصابات الفيروسية (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).

مزارع القمة الخضرية الميرستيمية

يستفاد من مزارع القمة الخضرية الميرستيمية Meristem Shoot Tip Culture (شكل ٦-١٠) فى إنتاج نباتات خالية من الإصابات الفيرسية، ويعد ذلك أمرًا بالغ الأهمية فى المحاصيل التى تتكاثر خضريًا، والتى تنتقل فيها الفيروسات تلقائيًا مع الأجزاء الخضرية المستخدمة فى التكاثر

وبرغم أن النباتات قد تكون مصابة جهازيًا بالفيروسات إلا أن القمة الميرستيمية النامية تكون غالبا خالية تمامًا من الفيروسات، أو لا تحتوى إلا على قليل جدًا منها، ويرجع ذلك إلى الأسباب الآتية

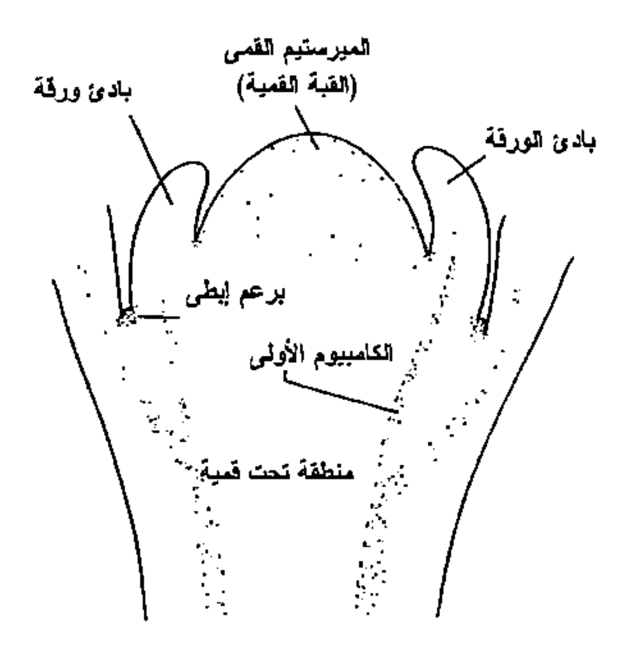
١ — خلو القمة الميرستيمية من الأنسجة الوعائية التى يكون انتقال الفيروسات فيها سريعًا، بينما يكون انتقالها خلال الروابط البروتوبلازمية أبطأ من سرعة نمو القمة النامية

٢ — يكون النشاط الأيضى فى الخلايا الميرستيمية عاليًا بدرجة يقل معها تكاثر الفيرس فيها

٣ - تكون نظم المقاومة لتكاثر الفيروسات أعلى من الأنسجة الميرستيمية مما فى أى نسيج آخر

٤ - قد يثبط التركيز العالى للأوكسين الطبيعى فى القمة النامية نشاط الفيروسات فيها

ولهذه الأسباب كلها فإن فصل القمة الميرستيمية (شكل ٦-١١، يوجد فى آخر الكتاب) وزراعتها فى بيئة صناعية يؤدى إلى إنتاج نباتات خالية من الإصابات الفيرسية وقد استخدمت هذه التقنية تجاريًا، لإنتاج نباتات خالية من الفيرس من عديد من الأنواع النباتية، مثل الفراولة (شكل ٦-١٢، يوجد فى آخر الكتاب). والبطاطس، والبطاطا، والروبارب، والكاسافا، والكرسون المائى، واليام، وقصب السكر، والتفاح، والموز، وعديد من نباتات الزينة التى تتكاثر خضريًا، والأسبرجس (شكل ٦-١٣، يوجد فى آخر الكتاب)



شكل (٦-١٠): القمة الخضرية لنبات ثنائى الفلقة، تظهر فيها القمة الميرستيمية ومبادئ الأوراق المحيطة بها، وما فى آباطها من براعم إبطية (عن Wang & Charles ١٩٩١)

يتكون الميرستيم القمى - عادة - من قبة من النسيج تقع فى قمة النمو الخضرى وتقدر بنحو ٠,١ مم فى القطر، وحوالى ٠,٢٥-٠,٣ مم فى الطول. وتتشكل القمة الخضرية النامية shoot apex من تلك القمة الميرستيمية apical meristem مع بادئة ورقية صغيرة واحدة إلى ثلاث بادئات، تقدر كلها بنحو ٠,١ إلى ٠,٥ ملليمترًا

وقد يتكون الجزء النباتى الذى يستخدم فى الزراعة explant فى مزارع القمة الميرستيمية إما من القبة الميرستيمية القمية فقط، وإما من تلك القبة مع قليل من مبادئ الأوراق المجاورة لها، علمًا بأن تواجد بعض مبادئ الوريقات مع القبة الميرستيمية - التى تقطع بطول حوالى ٠,٣-٠,٥ مم - يفيد فى نجاح الزراعة.

أما مزارع الإكثار الدقيق التى يكون فيها النبات الذى يُراد إكثاره خالٍ أصلاً من الإصابات الفيروسية، فإنه تفضل زراعة القمة الخضرية بطول ٢ سم (عن Chawla ٢٠٠٠).

ويقسم الميرستيم القمي – عادة – إلى منطقتين، هما:

١ – الميرستيم الأولى promeristem . وهو الذى يتكون من الخلايا الميرستيمية القمية والخلايا المجاورة لها.

٢ – الميرستيم المحيطى peripheral meristem .. وهو الميرستيم الذى يوجد أسفل الميرستيم الأولى ويحيط به جانبيًّا ومن أسفله، ويمكن أن يميز به كلا من مبادئ الأوراق leaf primordia، والكامبيوم الأولى procambium، والميرستيم الأساسى ground meristem.

وعند زراعة القمة النامية الميرستيمية فإن الجزء المستخدم فى الزراعة يكون هو القبة القمية apical dome، وهى المنطقة التى تكون محصورة داخل مبادئ الأوراق، والتى يتراوح قطرها بين ٠,٠٧٥، و ١٢٠ مم، وطولها بين ٠,٢، و ٠,٢٥ مم ولا تتصل تلك القبة القمية بجهاز وعائى مع أى من الأنسجة المكونة للميرستيم المحيطى؛ الأمر الذى يفيد – كثيرًا – فى منع وصول المسببات المرضية – وخاصة الفيروسات – إلى القبة القمية

وعمليًّا . تستخدم – عادة – فى الزراعة القبة القمية (الميرستيم الأولى) مع بعض مبادئ الأوراق المحيطة بها وإذا ما تضمن الجزء المزروع جزءًا من الساق يحتوى على جزء – ولو يسير – من النسيج التالى للنسيج الميرستيمى تحت القمى، فإن طريقة الإكثار يجب أن تكنى باسم مزارع القمة النامية shoot tip culture (شكل ٦–١٤)، وليس meristem culture، علمًا بأن فصلهما يكون تحت المجهر (Wang & Charles ١٩٩١)

ويعتبر فصل القمة النامية سريعًا – دون إحداث أضرار بها – من أهم مقومات نجاح مزارع القمة الميرستيمية. هذا .. بالإضافة إلى أهمية بيئة الزراعة التى يجب أن تكون محفزة لتكوين الجذور والأوراق من القمم الميرستيمية المزروعة.

وتتطلب زراعة القمة الميرستيمية – عادة – بيئات تحتوى على تركيز منخفض من السيتوكينين وتركيز متوسط من الأوكسين، ولكن تلزم إعادة الزراعة فى بيئة خالية من الأوكسين لتحسين التجذير.

1.

٥ مم

إزالة الأوراق الحرشفية
والأوراق الخارجية

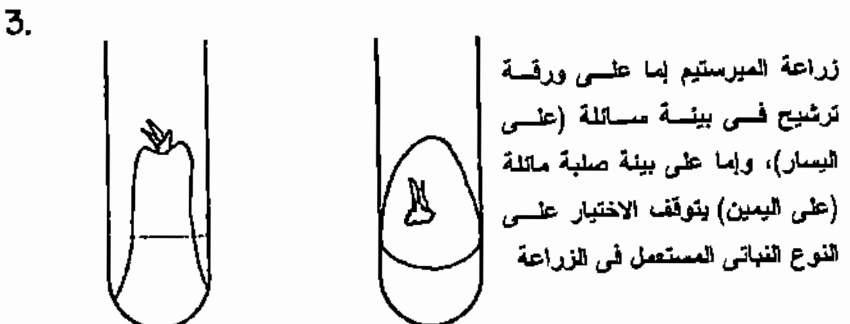
2.

إزالة مبادئ الأوراق
وأنسجة الساق

عزل الميرستيم القمى
(القبة + بادئ ورقة)

۰.۱ مم

3.



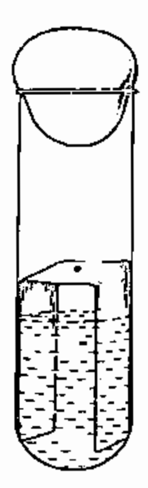
شكل (٦-١٤): فصل القمة النامية الميرستيمية وزراعتها (عن Mantell وآخرين ١٩٨٥).

وتزداد فرصة تميز النباتات فى المزرعة كلما ازداد حجم القمة الميرستيمية المزروعة، ذلك لأن القمم الصغيرة تنتهى غالبًا بتكوين جذور وكالس، وربما لا تعطى جذورًا ألبتة إن كانت صغيرة جدًا، فى حين أن القمم الخضرية الكبيرة قد لا تكون خالية من الفيرس؛ لذا .. فإن القاعدة هى أن تكون القمم الميرستيمية المزروعة صغيرة بالقدر الذى

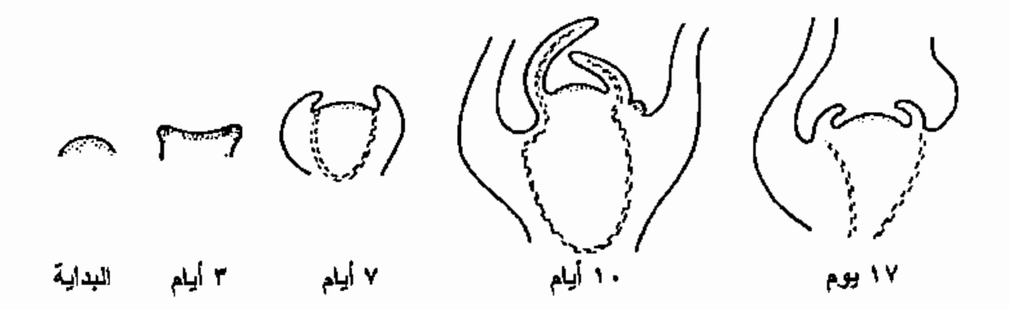
يضمن خلوها من الفيرس، وكبيرة بالقدر الذى يسمح بتميزها إلى نباتات مكتملة النمو. وعمومًا فإن طول القمة الميرستيمية التى تستعمل فى الزراعة يختلف باختلاف النوع النباتى، وهى تتراوح فى الفراولة - على سبيل المثال - بين ٠,٥، و ٠٩ مم لأفضل تجديد للنمو مع التخلص من الإصابات الفيروسية.

وقد وجد أن النباتات المصابة جهازيًا بالفيروسات تعطى عند زراعة أى من أنسجتها المصابة خلايا كالس، تختلف فى محتواها من الفيرس، وأمكن الحصول على نباتات خالية من الفيرس من خلايا الكالس السليمة فى هذه المزارع كذلك .. وجد أن نسبة النباتات الخالية من الفيرس كانت أعلى بكثير من النباتات التى تميزت من الكالس فى مزارع القمة الميرستيمية عما فى النباتات التى تميزت من القمة الميرستيمية مباشرة وربما يرجع السبب فى ذلك إلى أن سرعة تكاثر الفيرس تكون أقل من سرعة تكاثر الخلايا فى نسيج الكالس. هذا .. إلا أن كثيرًا من الأنواع النباتية الهامة لم تتميز فيها نباتات من نسيج الكالس، كما أن هذا النسيج لا يكون ثابتًا وراثيًا.

بعد فصل القمة الميرستيمية، فإنه يفضل وضعها على قنطرة من ورقة ترشيح مغمورة - جزئيًا - فى بيئة سائلة فى أنبوبة اختبار (شكل ٦-١٥)، حتى تكبر بالقدر الكافى (شكل ٦-١٦) قبل نقلها إلى بيئة سائلة.



شكل (٦-١٥): تقنية زراعة القمة الميرستيمة على قنطرة من ورقة تشريح مغمورة جزئيًا فى بيئة سائلة فى أنبوبة اختبار.



شكل (٦-١٦): مراحل نمو القمة الميرستيمية لنبات القرنفل بدءًا من فصلها حتى اليوم السابع عشر من زراعتها فى بيئة موراشيج وسكوج مزودة بالكينتين وإندول حامض الخاليك. يلاحظ بدء ظهور محورى النمو الخضرى والجذرى من اليوم السابع، وعدة أوراق بدءًا من اليوم العاشر للزراعة (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

هذا .. ويستفاد من مزارع القمة الميرستيمية فى ثلاثة جوانب تتعلق بإكثار النباتات الاقتصادية هى كما يلى:

١ – الاستفادة من ظاهرة خلو القمم الميرستيمية من الإصابات الفيرسية فى عملية الإكثار الدقيق ذاتها؛ لضمان خلو آلاف النباتات المنتجة بهذه الطريقة من أية إصابة فيروسية أو ميكوبلازمية.

٢ – عمل إكثار أولى للنباتات الخضرية التكاثر التى تصاب بشدة بالأمراض الفيروسية؛ لإنتاج تقاوٍ من الفئات الممتازة التى تكثر بعد ذلك خضريًا، لإنتاج التقاوى التى يستخدمها المزارعون، وتلك هى الطريقة التى تتبع فى إكثار تقاوى البطاطس والفراولة التى تصاب بنحو ٦٢ مرضًا تسببها فيروسات وميكروبلازمات.

٣ – إعادة إنتاج نباتات خالية من الفيرس من الأصناف القديمة للمحاصيل الخضرية التكاثر التى لم يعد فيها نبات واحد خال من الإصابات الفيرسية، كما حدث بالنسبة لبعض أصناف البطاطس.

وتعد هذه الطريقة فى الإكثار سهلة ومناسبة لعديد من النباتات العشبية، مثل: القرنفل، والبطاطس، والأقحوان، والأوركيد، والفراولة.

العوامل المؤثرة فى عملية الإكثار الدقيق

تتأثر عملية الإكثار الدقيق بالعوامل التالية:

أولاً: بيئة الزراعة

تؤثر بيئة الزراعة فى عملية الإكثار خلال مختلف المراحل، كما يلى.

١ – بداية الزراعة وتضاعف النموات:

أثبت مخلوط أملاح بيئة موراشيج وسكوج صلاحية للإكثار الدقيق فى عديد من الأنواع المحصولية. وغالبًا ما يمكن استعمال البيئة ذاتها لكل من بدء الزراعة culture initiation، وتضاعف النموات الخضرية shoot multiplication

وتتباين احتياجات منظمات النمو تبعًا للكيفية التى تتضاعف بها النموات الخضرية، علما بأن تميز الأعضاء يعتمد على التوازن بين مجموعتين من الهرمونات والتركيز النسبى لهما. وهما: الأوكسينات والسيتوكينينات. وتبعًا لذلك . فإن نسبة السيتوكينين المرتفعة مقارنة بنسبة الأوكسين تحفز تكوين النموات الخضرية، بينما تحفز نسبة الأوكسين المرتفعة مقارنة بالسيتوكينين تكوين الجذور ولا يعنى ذلك أنه لتحفيز كل من التفريع الجانبى وتكوين الجذور ينبغى توفر كلاً من الهرمونين فى البيئة وعلينا أن نتذكر – كذلك – أن الاحتياجات الإضافية من الهرمونات التى يتعين تزويد بيئة الزراعة بها تتوقف على مستواها فى النبات المزروع؛ الأمر الذى يختلف باختلاف الجزء النباتى explant المستعمل فى الزراعة، والنوع النباتى، ومرحلة النمو النباتى ومن ثم فإن تضاعف النمو الخضرى لا يتطلب بالضرورة تزويد بيئة الزراعة بأوكسين إضافى وفى كثير من الأحيان يكفى تزويد البيئة بالسيتوكينين فقط لإحداث التضاعف المطلوب فى النموات الخضرية

ويتعين تحديد الاحتياجات الكمية من كل من السيتوكينين والأوكسين لإحداث أقصى تضاعف ممكن، الأمر الذى يتحدد – لكل نوع نباتى – بسلسلة من التجارب ولقد استعملت السيتوكينينات بتركيز ٠.٥–٣٠ مجم/لتر، إلا أن تركيز ١–٢ مجم/لتر يعد مناسبًا فى معظم الحالات، علمًا بأن تركيزات السيتوكينيات الأعلى تستحث تكوين

البراعم العرضية بسرعة كبيرة؛ حيث يكون من الصعب تحديد أصل كل نمو منفرد عند تجديد الزراعة. وباستعمال تركيز منخفض من السيتوكينين (٥ مجم/لتر من 2-ip) .. فإن تكوين النموات العرضية ينخفض كثيرًا، ولكن يظل من المكن تحقيق ٣-٦ تضاعفات فى النموات كل ٦ أسابيع من خلال تحفيز التفريع الجانبى. وفى النباتات التى لا تكون فيها البراعم العرضية مأمونة الجانب فى عملية الإكثار الدقيق، فإنه يتعين التضحية بالكمية لأجل النوعية الجيدة. كذلك فإن زيادة تركيز السيتوكينين قد يحدث تشوهات مورفولوجية، كالأوراق المشوهة فى البيجونيا.

وفى التركيزات العالية من السيتوكينينات قد تزداد أعداد النموات الخضرية المتكونة إلا أن نمو كل واحد منها يبقى مقيدًا؛ الأمر الذى قد يتطلب خطوة زراعة إضافية فى بيئة ذات محتوى منخفض من السيتوكينين — وربما فى وجود حامض الجبريلليك — لأجل تحفيز استطالة النموات، قبل محاولة تجذيرها (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

ومن بين مختلف الأوكسينات فإن إندول حامض الخليك IAA هو أكثرها ثباتًا؛ ولذا . فإن الأوكسينات المخلقة، مثل NAA، و IBA هى المفضلة للاستعمال فى بيئات مزارع الأنسجة ولأجل تضاعف النموات الخضرية ينبغى أن يتراوح تركيزها بين ٠.١ إلى ١ مجم/لتر. وبسبب تأثيره القوى فى تحفيز تكوين الكالوس .. فإن الـ 2,4-D لا يستخدم عند الرغبة فى إحداث تضاعف للنموات الخضرية من خلال التفريع الجانبى أو تكوين البراعم العرضية. ولكن يعد الـ 2,4-D أهم أوكسين للاستعمال عند الرغبة فى تحفيز تكوين الأجنة الجسمية.

ونظرًا لأن البيئات شبه الصلبة هى الأسهل فى عمليات التداول؛ لذا .. فإن بيئات الإكثار الدقيق يضاف إليها الآجار بتركيز ٠.٦-٠.٨٪، إلاّ أن بعض الأنواع النباتية تناسبها البيئات السائلة.

٢ — التجذير:

وجد أن البيئات ذات المحتوى المنخفض من الأملاح أكثر مناسبة لتجذير عدد كبير

من الأنواع النباتية عن تلك التى تحتوى على تركيز مرتفع من الأملاح، حيث تستعمل – عادة – بيئة موراشيج وسكوج بنصف قوتها، أو حتى بربع قوتها.

وقد ذكر أن الريبوفلافين يُحَسِّن من عملية التجذير فى النوع *Eucalyptus ficifolia*

ثانياً: الضوء

يؤثر الضوء فى عملية الإكثار الدقيق خلال مختلف مراحلها، كما يلى.

١ – بدء الزراعة وتضاعف النموات.

على الرغم من أن نموات المزارع تكون خضراء اللون، فإنها لا تعتمد على البناء الضوئى لتصنيع احتياجاتها من الغذاء؛ فهى تنمو كـ heterotrophs معتمدة فى كل غذائها العضوى وغير العضوى على بيئة الزراعة، وتقتصر الاحتياجات الضوئية لتلك المزارع – فقط – على عمليات التميز المورفولوجى، وتكفى لذلك إضاءة قوتها ١٠٠٠–٣٠٠٠ لكس، علمًا بأن ١٠٠٠ لكس هى القوة الأنسب لعدد كبير من الأنواع النباتية، وأن قوة تزيد عن ٣٠٠٠ لكس تعد مثبطة للنمو. أما الفترة الضوئية فهى ليست حرجة، ولكن يناسب معظم المزارع إضاءة مدتها ١٦ ساعة بالتبادل مع ٨ ساعات من الظلام

٢ – التجذير.

يعد التجذير فى المزارع ضروريًا للقيام بعملية الشتل وللتخفيف من صدمة الشتل ويعمل خفض مستوى السكروز إلى حوالى ١٪ مع زيادة شدة الإضاءة إلى ٣٠٠٠–١٠٠٠٠ لكس خلال مرحلة التجذير على تحويل النبات من الاعتماد على البيئة فى غذائه (heterotrophic) إلى الاعتماد على نفسه (autotrophic)، كما تحفز الإضاءة العالية التجذير الجيد، وتزيد من تقسية النباتات. وقد تبدو النباتات فى ظروف الإضاءة العالية أقل اخضرارًا وقوة فى النمو، إلا أنها تكون أقدر على تحمل عملية الشتل عن النباتات الطويلة الخضراء التى تبقى معرضة لإضاءة منخفضة (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

هذا . وقد وجد فى مزارع البطاطس أن إضاءة شدتها ١٠٠ لكس كانت مناسبة لبدء

المزرعة،مع إمكان زيادة شدة الإضاءة إلى ٢٠٠٠ لكس بعد أربعة أسابيع من التحضين. ومع بلوغ النمو الخضرى ١ سم طولاً .. تجب زيادة الإضاءة إلى ٤٠٠٠ لكس. وتعد الإضاءة العالية تلك مفيدة فى زيادة معدل بقاء المزرعة عندما تبدأ النموات فى الازدياد عددًا وطولاً، وبعد نقلها إلى بيئة التجذير. وتعد تلك القيم لشدة الإضاءة مناسبة لأنواع نباتية أخرى كثيرة، منها الأسبرجس، والجيربيرا *Gerbera*. وإن كان من الممكن زيادة شدة الإضاءة فى المرحلة الأخيرة حتى ١٠٠٠٠ لكس.

ونظرًا لأن الضوء يحفز التلون البنى فى الأجزاء المزروعة ذات المحتوى العالى من البولى فينول polyphenol، فإنه يوصى بخفض شدة الإضاءة إلى أقل من ١٠٠٠ لكس، أو تحضين المزرعة فى الظلام. وفى البلارجونيم *Pelargonium* يتحتم توفير ظلام كامل لفترة فى مزارع القمة الخضرية لتجنب التأثير المثبط لنشاط إنزيم البولى فينول أوكسيديز فى ظروف الإضاءة. وعلى العكس من ذلك .. فإن الإضاءة أفضل من الإظلام بالنسبة للبطاطس.

وللحصول على أكبر قدر من النمو ومنع دخول المزرعة فى حالة سكون تفضل — فى معظم الحالات — توفير فترة ضوئية طويلة تبلغ — عادة — ١٦ ساعة بالتبادل مع ٨ ساعات ظلام. وفى الغالب تتوفر الإضاءة من لمبات فلورسنتية بيضاء باردة، وقد تستعمل أحيانًا لمبات تونجستين صغيرة — بالإضافة إلى اللمبات الفلورسنتية — لتزويد المزرعة بكل من الضوء الأحمر والأشعة تحت الحمراء (عن Wang & Charles ١٩٩١).

ثالثًا: درجة الحرارة

تتباين درجة الحرارة المثلى المناسبة لمزارع الإكثار الدقيق باختلاف النوع النباتى — المزروع، وهى لا تختلف كثيرًا عن الاحتياجات الحرارية العادية تحت ظروف الزراعة الطبيعية، وغالبًا ما تتراوح حرارة تحضين المزارع بين ٢٠، و ٢٨ْم، وتكون أكثرية الأنواع النباتية فى منتصف ذلك المدى. وفى أغلب الحالات تبقى الحرارة ثابتة على مدى اليوم، لكن بعض الأنواع يناسبها تباين قدره ٥ْم فى درجة الحرارة. ويؤدى ارتفاع الحرارة عن ٢٨ْم إلى تكثف الماء على النباتات وجدران الأوعية؛ مما قد يحد من النمو.

وعادة لا يتم التحكم فى الرطوبة النسبية أثناء تحضين المزارع، وإذا تم التحكم فيها . فإنها تكون غالبًا بين ٦٠٪، و ٨٠٪، والأفضل ضبطها عند ٧٠٪ (Wang & Charles ١٩٩١).

التحديات التى تواجه عمليات الإكثار الدقيق

إن من أهم المشاكل التى قد تواجه عملية الإكثار الدقيق، ما يلى.

١ – التلوث الميكروبى·

يعد التلوث الفطرى والبكتيرى من أكبر المشاكل التى لا تسمح بنمو المزارع وتؤدى إلى حتمية التخلص منها. ويمكن التغلب على تلك المشكلة بتنمية النباتات التى يؤخذ منها الأجزاء التى تستعمل فى زراعة الأنسجة فى غرف نمو، مع التعقيم الجيد لتلك الأجزاء. وإجراء كل عمليات الزراعة فى البيئات فى Laminar Air Flow Cabinets مزودة بمرشحات HEPA (٢٠ ميكروميتر)، واستعمال أدوات تشريح معقمة ويفيد تبخير حجرات الزراعة باستعمال محلول فورمالين مخفف فى تقليل حالات التلوث الميكروبى

٢ – تلون بيئات الزراعة باللون البنى·

تفرز الأجزاء النباتية المزروعة من بعض النباتات – مثل قصب السكر – مركبات فينولية فى بيئة الزراعة تؤدى إلى اكتسابها لونا بنيًا، وتقليل نمو الأجزاء النباتية المزروعة فيها. ويرجع هذا التلون إلى تأكسد المركبات الفينولية العديمة اللون وتحولها إلى مركبات أخرى بنية اللون. ويمكن الحد من ظاهرة التلون البنى بتزويد بيئة الزراعة بالفحم النباتى النشط بنسبة ٠,١–٠.٢٪، أو بحامض الستريك أو حامض الأسكوربيك بتركيز ٥٠٠–١٠٠٠ مجم/لتر، أو بالبولى فينيل بيروليدون polyvinylpyrrolidone (اختصارًا: PVP)

٣ – تكوين الكالس·

على الرغم من أن تكوين الكالس callusing قد يكون مرغوبًا فيه أحيانًا، إلاّ أنه غالبا ما يكون أمرا غير مرغوب فيه، نظرًا لأن كتلة خلايا الكالس غير المتميزة تؤثر فى

التطور الطبيعى لكل من النمو الخضرى والجذرى، وقد يؤدى إلى ظهور تباينات وراثية فى النباتات التى يتجدد نموها. ومن بين الوسائل التى تحد من ظاهرة تكوين الكالس تزويد البيئة بالـ triiodobenzoic acid، والـ phloroglucinol، والـ phloridzin، أو خفض تركيز الأملاح غير العضوية فى بيئة الزراعة.

٤ – التزجج:

التزجج vetrification هو ظهور نباتات غير طبيعية المظهر (زجاجية المظهر ونصف شفافة) فى بيئة الزراعة، وخاصة عند استعمال بيئات سائلة. تبدو هذه النباتات غير طبيعية المظهر بسبب النمو غير الطبيعى لأوراق نباتات المزارع، وقلة محتواها من الشمع الأديمى، وضعف كفاءتها فى البناء الضوئى، وعدم قيام الثغور بوظائفها. ويمكن الحد من تلك الظاهرة بجعل ظروف الزراعة تسمح بحركة الماء والغذاء والعناصر فى النبات من خلال خفض الرطوبة النسبية فى أوعية الزراعة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

٥ – حساسية النباتات الصغيرة الناتجة من الإكثار الدقيق لصدمة الشتل:

إن أكبر مشكلة فى عملية الإكثار الدقيق هى موت نسبة كبيرة من النبات فى مرحلة الأقلمة، أى بعد نقلها من مزرعة الإكثار إلى بيئات النمو العادية.

ولزيادة فرصة بقاء النباتات المكثرة خلال مرحلة الـ acclimatization فإن الظروف البيئية فى بدايات تلك المرحلة يجب أن تقترب من ظروف مرحلتى النمو التكاثرى والتجذير فى البيئة الصناعية. ولزيادة فرصة بقاء النباتات المتأقلمة بعد نقلها إلى المكان الدائم لنموها، يجب أن تقترب الظروف البيئية عند اقتراب نهاية فترة الأقلمة من الظروف التى سوف تتعرض لها النباتات بعد النقل الدائم .. هذا فى الوقت الذى يجب فيه تحفيز عملية البناء الضوئى خلال عملية الأقلمة.

ومن أهم العوامل التى يجب توفيرها خلال مرحلة الأقلمة الرطوبة النسبية العالية، وخاصة فى المراحل المبكرة من فترة الأقلمة، ويتحقق ذلك بتغطية النباتات الصغيرة بغشاء بلاستيكى، مع التظليل والتضبيب (misting) المتكرر. ويعد التظليل ضروريًا لأن ضوء الشمس القوى ذاته قد يضر بالنباتات الصغيرة، كما قد يزيد من فقد النباتات لرطوبتها بسبب رفعه لدرجة الحرارة؛ ومن ثم خفضه للرطوبة النسبية.

وبينما يعد التضبيب أسهل وسيلة لرفع الرطوبة النسبية، فإنه يضعف عملية البناء الضوئي، ومن ثم يبطئ من عملية تجذير النباتات الصغيرة واعتمادها على ذاتها فى تحضير غذائها وامتصاصها لاحتياجاتها من الماء والعناصر. ومع تقدم عملية الأقلمة تُخَفَّض – تدريجيًّا – شدة التظليل ومعدلات التضبيب (عن Kozai ١٩٩١)

٦ – التباينات الوراثية التى تظهر فى مزارع الإكثار الدقيق.

بينما قد تكون تباينات مزارع الأنسجة أمرًا مرغوبًا فيه بالنسبة لمربى النبات الذى يسعى – دائمًا – إلى الحصول على تلك التباينات التى قد تفيده فى برامج التربية، إلاَّ أنها لا تفيد – أبدًا – فى عملية الإكثار الدقيق التى يجب أن تعطى نباتات متجانسة وصادقة للصنف المكثر (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

تطبيقات الإكثار الدقيق فى مجال تربية النباتات وإكثارها

استعراض التطبيقات

إن من أهم تطبيقات مزارع الإكثار الدقيق التى تخدم تربية النبات، ما يلى:

١ – التخلص من الفيروسات

يتبع فى التخلص من الفيروسات الطرق التالية:

أ – المعاملة الحرارية:

تعرف تلك المعاملة باسم thermotherapy، وبمقتضاها تعرض النباتات لحرارة عالية نسبيًّا، وهى تستخدم فى التخلص من الفيروسات والميكوبلازما، وقد تستعمل منفردة، أو مع المعاملة الكيميائية، أو مع مزارع القمة الميرستيمية، أو مزارع القمم النامية المجزأة.

ب – استعمال مضادات الفيروسات:

تعرف تلك المعاملة باسم chemotherapy، وبمقتضاها تعامل الأجزاء النباتية التى تؤخذ منها الأجزاء (explants) التى تستعمل فى الزراعة، وذلك قبل فصلها. هذا وقد تضاف تلك المركبات الكيميائية إلى بيئة الزراعة – كذلك – وذلك لأجل دعم عملية التخلص من الفيروسات ويستخدم لهذا الغرض مركبات مثل مالاشايت جرين malachite green، وفيراكسول viraxole.

جـ – مزارع القمة الميرستيمية:

يتضمن الجزء النباتى explant الذى يستخدم فى مزارع القمة الميرستيمية القبة الميرستيمية، بالإضافة – عادة – إلى زوج من مبادئ الأوراق.

د – مزارع القمم النامية المجزأة fragmented shoot apices culture:

تستعمل مزارع القمم النامية المجزأة على نطاق واسع فى إكثار العنب.

هـ – التطعيم الدقيق فى البيئات الصناعية in vitro micrografting.

هذا .. ويجب أن نتذكر أن النباتات الناتجة من مزارع الإكثار الدقيق لا تكون – بالضرورة – خالية من الفيروسات وإنما هى غالبًا ما تكون خالية، ويلزم إجراء اختبارات عليها للتأكد من خلوها من الإصابات الفيروسية. ومن بين الاختبارات الشائعة الاستعمال لهذا الغرض اختبار الإيزا ELISA.

وعلى الرغم من احتمال إصابة النباتات بالفيروسات بعد نقلها إلى حقل الزراعة، إلاّ أن بدء زراعتها وهى خالية من الفيروسات يعطيها دفعة قوية من النمو.

٢ – الإكثار التجارى للنباتات الخضرية التكاثر:

يمكن إكثار نبات واحد إلى عدة ملايين من النباتات فى خلال عام واحد، الأمر الذى يستحيل تحقيقه بطرق التكاثر العادية، وبذا .. فإن الإكثار الدقيق يعد أدة غاية فى الأهمية لإسراع تكاثر الأنواع الخضرية التكاثر.

كذلك يفيد الإكثار الدقيق فى الإكثار التجارى للنباتات الخضرية التكاثر مع المحافظة على صفة التجانس، كما حدث بالنسبة لمحاصيل الخرشوف (إيطاليا)، والثوم (التشيك وسلوفاكيا)، والبطيخ الثلاثى (رومانيا)، والروبارب (بلجيكا)، وفجل الحصان (ألمانيا)، وغيرهم.

٣ – تسهيل إكثار الأجزاء النباتية المسنة – التى يصعب غالبًا إكثارها خضريًا – بإعادة الحداثة إليها فى مزرعة أنسجة، ثم إكثارها بعد ذلك

٤ – غالبًا ما تكون النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة أقوى نموًا عن مثيلاتها الناتجة من الإكثار العادى؛ بسبب استعادتها لحداثتها، أو لخلوها من الإصابات

الفيروسية، وبذا فإن الإكثار الدقيق يفيد في استعادة النباتات المعمرة لحداثتها بعدما تكون قد وصلت إلى مرحلة الشيخوخة.

٥ – يعد الإكثار الدقيق وسيلة سهلة واقتصادية – كذلك – في الأنواع التي يعد إكثارها معقدا وبطيئًا.

٦ – يمكن إكثار الجيرمبلازم بسهولة على صورة مزارع أنسجة، مع المحافظة عليه خاليًا من الإصابات الفيروسية، ودونما حاجة إلى إعادة تجديد الزراعة على فترات متقاربة، خاصة عند حفظ المزارع في النيتروجين السائل (تراجع تفاصيل الموضوع تحت عنوان لاحق)

٧ – تسهيل مهمة انتقال الجيرمبلازم عبر الحدود بين الدول على صورة مزارع أنسجة خالية من الإصابات المرضية، دونما حاجة إلى إجراءات الحجر الزراعي

٨ – إن إنتاج الدرنات الصغيرة جدًا (الـ microtubers) في البيئات الصناعية من أجزاء نباتية خالية من الفيرس أثبت جدواه كطريقة فعالة لإكثار الجيرمبلازم، وتخزينه، وانتقاله من دولة لأخرى، على الأقل في كل من البطاطس واليام

٩ – الإكثار التجاري السريع للنباتات البذرية التكاثر.

يمكن في النباتات البذرية التكاثر – وخاصة خلطية التلقيح منها – إكثار النباتات الفردية ذات الصفات المتميزة دونما حاجة إلى تأصيلها، مع إمكانية تخزينها، واستعمالها في أغراض التربية، والحصول على انعزالات وراثية منها – فيما بعد عندما تلجأ إلى إكثارها جنسيًا.

١٠ – يفيد الإكثار الدقيق في المحافظة على التركيب الوراثي للنباتات المكثرة دونما تغيير، كما في سلالات آباء الهجن في القنبيط، وكذلك في الإكثار السريع للأصناف الجديدة التي تنتج من برامج التربية

١١ – يمكن إكثار السلالات المزروعة في البيئات في أي وقت من السنة؛ حيث تعد بيئات الزراعة بمثابة مشتل دائم، الأمر الذي لا يمكن تحقيقه بوسائل الإكثار العادية.

١٢ – الحد من الحاجة إلى الصوبات الزراعية في عمليات الإكثار، مما يقلل من تكلفتها

١٣ – يفيد الإكثار الدقيق – كذلك – أثناء التربية الداخلية، التى تجرى لأجل تجانس السلالات، ومن ثم تحسين تجانس الهجن التى تستعمل تلك السلالات فى إنتاجها.

ويفيد الإكثار الدقيق – فى هذا الشأن – من بعض الوجوه، كما يلى:

أ – بعد إجراء التلقيح الذاتى – فى نهاية برنامج التربية الداخلية – يكون محصول بذور النباتات الفردية قليلاً للغاية، ولكن إذا ما أكثر النبات – الذى يرغب فى تلقيحه ذاتيًا – عن طريق مزارع الأنسجة، فإنه يمكن الحصول من النباتات المكثرة (وهى التى تكون متماثلة وراثيًّا ويمكن تركها لتلقح بعضها بعضًا) على أعداد كبيرة من البذور، بما يسمح بإجراء الاختبارات اللازمة عليها، ومن ثم توسيع أساس الانتخاب، وإمكان استخدامها فى إنتاج الهجن مباشرة.

ب – يمكن عن طريق عملية الإكثار الدقيق إدامة السلالات المرباة داخليًّا العقيمة الذكر دونما حاجة إلى سلالات الإدامة maintainer lines، مما يقلل من الوقت اللازم للانتهاء من برنامج التربية، مع تجنب مشكلة ظهور نباتات خصبة الذكر كانعزالات فى سلالة الأمهات العقيمة الذكر.

١٤ – للإكثار الدقيق أهمية كبيرة فى إنتاج هجن الجيل الأول من الخضر فضلاً .. يستحيل فى النباتات وحيدة الجنس ثنائية المسكن – مثل الأسبرجس – إنتاج سلالات هجين دون اللجوء إلى الإكثار الدقيق. وفى الكرنب الذى يعتمد فيه إنتاج الهجن على خاصية عدم التوافق – وحيث يعتمد إكثار سلالات الآباء على التلقيح البرعمى الذى يفقدها قوة النمو – فإن مزارع الأنسجة يمكن أن تستخدم فى إكثار تلك السلالات.

١٥ – يمكن بالإكثار الدقيق عزل وإكثار الكيميرا والطفرات الطبيعية، والحصول على أفراد طفرية كاملة عندما تجرى المعاملة بالعوامل المطفرة فى المزرعة، ذلك لأن النباتات العرضية تنشأ – غالبًا – من خلية واحدة (تراجع تفاصيل الموضوع تحت عنوان لاحق).

١٦ – استنبات البذور:

إن استعمال البيئات الصناعية فى استنبات البذور قد يكون عمليًّا مع البذور الصغيرة جدًّا مثل بذور الأوركيد الذى استعملت المزارع الصناعية فى إكثاره تجاريًّا بنجاح منذ

فترة طويلة نجد فى الطبيعة أن بذور الأوركيد تعتمد فى إنباتها على علاقة تبادل منفعة مع بعض الكائنات الدقيقة فى قلف الأشجار، حيث توفر لها بعض العناصر المغذية، وقد وجد أن من الممكن توفير تلك المغذيات فى البيئات الصناعية

١٧ – إمكان إنتاج البذور "الصناعية" artificial seeds عن طريق "كبسلة" الأجنة الجسمية التى تنتج فى مزارع الإكثار الدقيق (تراجع تفاصيل الموضوع تحت عنوان لاحق)

١٨ – مع إمكان تجديد نمو البروتوبلاست، والخلايا، والأنسجة فى المزارع، يكون من الممكن إجراء عملية التحول الوراثى (الهندسة الوراثية) للصفات الهامة

هذا وقد استخدمت تقنية الإكثار الدقيق – بالفعل – فى تطوير إنتاج أصناف جديدة محسنة مفتوحة التلقيح من القنبيط والكرفس، وفى إنتاج بعض هجن الكرنب وكرنب بروكسل، وفى إكثار بعض هجن الأسبرجس (عن Lerke & Bauch ١٩٩٢، و Pierik ١٩٩٣، و Chawla ٢٠٠٠).

التطبيقات فى مجال الإكثار التجارى

تستخدم طرق الإكثار الدقيق – حاليًا – فى الإكثار التجارى لعديد من الأنواع النباتية، نذكر منها ما يلى:

أولاً الزهور ونباتات الزينة

يمكن تقسيم الزهور ونباتات الزينة – حسب مدى التوسع فى تطبيق تقنيات الإكثار الدقيق فى إنتاجها – إلى ثلاث مجموعات، كما يلى:

١ – نباتات تكثر بسهولة بطرق الإكثار الدقيق على مدار العام بجودة عالية، وتكون – غالبًا – خالية من مسببات الأمراض، مثل:

Anthurium	*Alstomeria*
Chrysanthemum	*Caladium*
Drosera	*Diffenbachia*
Gloxinia	*Gerbera*
Heliconia	*Gypsophila*
Musa	*Freesia*

Nephrolepis *Nepeta*
Rhododendron *Philodendron*
Santpaulia *Rosa*

٢ — نباتات يمكن إكثارها بطرق الإكثار الدقيق، ولكنها بحاجة إلى مزيد من الاهتمام بتقنيات إكثارها، مثل:

Dianthus *Begonia*
Haemanthus *Gladiolus*
Hosta *Hemerocallis*
Iris *Hyacinth*
Pelargonium *Lilium*
Petunia

٣ — نباتات تكثر ببعض الصعوبة، ومازالت بحاجة إلى تطوير لطرق إكثارها، مثل:

Chamaecyparis *Acer*
Paeonia *Junipers*
Sequoia *Potentilla*
Howeia *Taxus*
Grevilla

ثانيًا: نباتات الخضر

١ — الفراولة:

تنتج الملايين من شتلات الفراولة سنويًا بطرق الإكثار الدقيق فى مختلف أنحاء العالم، وتتبع طريقة زراعة الميرستيم مع المعاملة الحرارية للتخلص من الفيروسات.

٢ — الأسبرجس:

تكثر السلالات المتميزة من الأسبرجس بنجاح بطرق الإكثار الدقيق.

٣ — الثوم:

تستخدم مزارع القمة الميرستيمية فى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات، وفى حفظ الجيرمبلازم.

٤ — يستخدم الإكثار الدقيق فى إنتاج تراكيب وراثية معينة — مثل السلالات العقيمة الذكر — من نباتات مثل الخيار، والطماطم، والبصل، وغيرها (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

٥ — البطاطس

يمكن أن تعطى تقنيات الإكثار الدقيق فى البطاطس حوالى ١٦٠٠ درنة من نبات بطاطس واحد سنويًا وربما أكثر من ذلك (George ١٩٨٦)

٦ القنبيط

أمكن باستخدام قرص القنبيط فى عملية إكثار دقيق الحصول على أكثر من ١٠٠٠٠ نبات صغير من كل قرص خلال فترة قصيرة للغاية لم تتعد عشرة أيام، وذلك فى دراسة استعمل فيها سبعة أصناف من المحصول. وتتلخص الطريقة فيما يلى أزيلت الطبقة الميرستيمية للقرص ووضعت فى الخلاط لفترة قصيرة، بهدف فصل التجمعات الميرستيمية عن بعضها، ثم دُرِّجت حسب الحجم بإمرارها من مناخل ذات ثقوب متدرجة وبهذه الطريقة أمكن الحصول على أكثر من ٤٠٠٠٠٠ explant (قمة ميرستيمية) من الحجم المثالى (١٠,٠-٣,٠ مم) من كل قرص وقد حُصل من كل explant على ١–٣ نموات بعد زراعتها فى بيئة موارشيج وسكوج سائلة مزودة بـ ٢ مجم كينيتن، و ١ مجم إندول حامض البيوتريك لكل لتر وقد وصلت النموات إلى طول ١–٣ مم فى خلال ١٠ أيام بمعدل أكثر من ١٠٠٠٠ نمو نباتى من كل قرص وقد جذُرت نحو ٨٠٪ من تلك النموات بعد ١٠ أيام من نقلها إلى بيئة موراشيج وسكوج شبه صلبه ومزودة بـ ١- ٣ مجم إندول حامض البيوتريك/لتر (Kieffer وآخرون ١٩٩٥)

٧ — تستخدم مزارع الأنسجة فى الإكثار الدقيق لعديد من المحاصيل الجذرية والدرنية، كما يلى:

المحصول	الـ explant المستعمل فى التكاثر
الكاسافا	القمة الميرستيمية
الكوكويام coco yam (*Xanthosoma* spp.)	القمة الخضرية
البطاطا	القمة الميرستيمية
اليام الحلو sweet yam (*Amorphophallus*)	أجزاء من الكورمة
القلقاس	القمة الخضرية
اليام (*Discorea alata*)	القمة الخضرية

ثالثا: نباتات الفاكهة

١ — التفاح

يقتصر استخدام زراعة الأنسجة فى التفاح — أساسًا — على إكثار الأصول الجذرية، مع ضرورة تقييم الطعوم التى تكثر بطرق الإكثار الدقيق — حقليًا — قبل نشر زراعتها تجاريًا

٢ — الكريز:

تتوفر تفاصيل طرق الإكثار — الدقيق للكريز بنوعية الحلو والحامض. وتستخدم التقنية لإكثار بعض الأصول الجذرية.

٣ — الخوخ والمشمش:

لم يكثر بطرق الإكثار — الدقيق سوى عدد محدود من أصناف الخوخ وأصوله، ولا يعرف سوى القليل جدًا عن الإكثار الدقيق للمشمش. وتعد مشاكل التجذير وعدم انتظامه فى هذين المحصولين من أهم العقبات التى تواجه تطبيق تقنيات الإكثار الدقيق عليهما على النطاق التجارى.

٤ — الكمثرى

لم تتطور تقنيات الإكثار الدقيق للاستعمال التجارى فى الكمثرى

٥ - الراسبرى والبلاكبرى.

يُكثر كلا من الراسبرى والبلاكبرى باستعمال مزارع العقل ذات العقدة الواحدة، وتتوفر تفاصيل التقنيات الخاصة بتلك الطريقة.

٦ — البلوبرى

يتكاثر البلوبرى بسهولة بالعقل، ويمكن استعمال مزارع الأنسجة فى إكثار النباتات المتميزة -- مبدئيًا -- قبل اللجوء إلى التكاثر بالعقل

٧ — العنب

بتوفر عدد من تقنيات مزارع الأنسجة لإكثار العنب تجاريًا وتخليصه من الفيروسات، وهى تستعمل فى إكثار السلالات المنتخبة، والهجن والأصناف الجديدة، والأصول.

٨ – الفاكهة الاستوائية:

تستخدم تقنيات مزارع الأنسجة فى إكثار – عديد من نباتات الفاكهة الاستوائية، مثل

المانجو	الأناناس	الباباظ
التين	التوت	الموز

(عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

التطبيقات فى مجال التربية بالطفرات

يستفاد من مزارع الإكثار الدقيق فى برامج التربية بالطفرات بإحدى طريقتين، هما إما بأخذ الأجزاء النباتية التى تستعمل فى الإكثار (explants) من نباتات أو أجزاء نباتية سبق تعريضها للعوامل المطفرة، وإما بتعريض مزرعة الإكثار الدقيق ذاتها (القمة النامية، أو البراعم العرضية على الأجزاء النباتية المزروعة، أو النموات الجانبية المتضاعفة، أو العقل وحيدة العقدة single node cuttings . إلخ) تعريضها للعوامل المطفرة

وتجدر الإشارة إلى أن تعريض مزارع الإكثار الدقيق للإشعاع قد يُحدث تغيرات كيميائية غير مرغوب فيها فى بيئات الزراعة؛ ولذا .. يوصى بنقل المزرعة التى عُرِّضت للإشعاع إلى بيئة جديدة بعد معاملة الإشعاع.

وعند المعاملة بالمركبات الكيميائية المطفرة يتعين تعقيم محاليل تلك المركبات بالترشيح قبل استعمالها (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

التطبيقات فى مجال التكاثر بالبذور الصناعية من الأجنة العرضية

أهمية تميز الأجنة العرضية

تتحقق الاستفادة من مزارع الأنسجة والخلايا فى الحصول على اختلافات وراثية جديدة، حتى إن تميزت النموات الخضرية من أنسجة الكالس مباشرة، إلاّ أن الفائدة

من الاختلافات الوراثية تتضاعف إذا تميزت الأجنة العرضية Adventitious Embryos في هذه المزارع، وذلك للأسباب التالية:

١ - تزداد فرصة العثور على الاختلافات الوراثية المرغوبة، نظرًا لأن كل خلية في المزرعة يمكن أن تتميز إلى جنين يعطي فردًا جديدا.

٢ - ولنفس السبب السابق .. فإن جميع خلايا الأفراد المتكونة الحاملة للطفرات تكون بها هذه الطفرات، ولا تكون الطفرات على شكل كيميرا، مثلما يحدث في حالة تميز النموات الجديدة من نسيج الكالس مباشرة.

٣ - يصعب - كثيرًا - في الحمضيات إنتاج نباتات خالية من الفيروسات عن طريق مزارع القمة النامية الميرستيمية، ولكنها تنتج بشكل روتيني من الأجنة اللاإخصائية التي تكون خالية تماما من الإصابات الفيروسية (تكون الأجنة الجنسية خالية - هي الأخرى - من الإصابات الفيروسية، ولكنها لا تصلح للإكثار التجاري)، إلا أن بعض أصناف الحمضيات تكون خالية من البذور، مثل البرتقال أبو سرة، والأصناف اللابذرية من اليوسفي والجريب فروت؛ وفي أصناف كهذه .. لا يمكن إنتاج نباتات خالية من الفيروسات إلا بطريق الأجنة العرضية، التي تتكون في مزارع الأنسجة والخلايا.

٤ - يحد تميز الأجنة العرضية من التغيرات الوراثية، التي تظهر عادة عند الإكثار الدقيق للأغراض التجارية، وهي التغيرات التي يزداد ظهورها عند تميز الأفراد الجديدة من نسيج الكالس مباشرة.

٥ - يفيد إنتاج الأجنة العرضية في تقصير فترة برنامج التربية في بعض الحالات، عندما تتجه النباتات التي تنمو من هذه الأجنة نحو الإزهار المبكر، ففي نبات الجنسنج ginseng . أعطت الأجنة العرضية التي أنتجت في مزارع كالس الجذور نباتات اتجهت مباشرة نحو الإزهار، وهو ما يعني توفير ثلاث سنوات في كل جيل من أجيال التربية بالنسبة لهذا النبات (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

هذا .. ولبعض الأنواع النباتية قدرة فائقة على تكوين الأجنة الجسمية العرضية، ومن ذلك الجزر، الذي تكوّن بادراته أجنة جسمية لدى زراعتها في بيئة تحتوي على حامض الأبسيسك كمنظم نمو وحيد (Nishiwaki وآخرون ٢٠٠٠)

أهمية البذور الصناعية

يُستفاد من عملية إنتاج البذور الصناعية بتغليف (كبسلة capsulation) الأجنة الجسمية — ناتج مزارع الأنسجة — فى الأمور التالية.

١ — إكثار النباتات الخضرية التكاثر بذريًا، الأمر الذى لا يمكن تحقيقه فيها باللجوء إلى البذور الحقيقية؛ بسبب ما يحدث فيها من انعزالات وراثية تكون مختلفة عن التركيب الوراثى للنبات الأصلى.

٢ — إكثار النباتات العقيمة بذريًا.

٣ — إمكان إكثار وزراعة النباتات القيمة التى تنتج من عملية دمج البروتوبلاستات، مع المحافظة على جميع خصائص الهجين الجسمى.

٤ — إكثار النباتات التى ترتفع أسعار بذورها الحقيقية.

كبسلة (تغليف) الأجنة الجسمية

تستخدم أغلفة الهيدروجل hydrogel — مثل ألجينيت الصوديوم sodium alginate — فى إنتاج بذور صناعية وحيدة الأجنة لعديد من الأنواع النباتية، مثل الكرفس، والجزر، والقطن، والخس، والبرسيم الحجازى، والأرز، والذرة. وتعد أكثر الأنواع النباتية مناسبة لهذه التقنية تلك التى يمكن إنتاج أجنتها فى مزارع الأنسجة بأعداد وفيرة، مع ارتفاع أسعار بذورها أو أن يكون لاستعمالها أساس تجارى قوى

ويمكن تصنيف المحاصيل الزراعية حسب توفر التقنية، والجانب الاقتصادى المتعلق بأسعار البذور الصناعية إلى ثلاث فئات، كما يلى:

١ — أنواع تتوفر التقنية لها .. مثل: الكراوية، والجزر، والـ *Panicum*، و الـ *Pennisectum*

٢ — أنواع ترتفع أسعار بذورها وأجزائها المستعملة فى التكاثر، ولاستعمالها أساس تجارى قوى . مثل: الأسبرجس، والبيجونيا، والبروكولى، والقنبيط، والخيار، والثوم، والجيرانيم، والخس، والبيتونيا، والبطاطس، والجنسنج، والأرز، والسبانخ، وقصب السكر، والتبغ، والطماطم، والبطيخ. هذا .. إلا أنه لا تتوفر لهذه المجموعة أساس تقنى جيد لإنتاج أجنتها الجسمية وبذورها الصناعية.

٣ – أنواع تتوفر التقنيات الخاصة بإنتاج أجنتها الجسمية وبذورها الصناعية ولاستعمالها أساس تجارى قوى .. مثل: البرسيم الحجازى، والكرفس، والبن، والذرة، والقطن، والعنب، والمانجو (عن Redenbaygh وآخرين ١٩٩١).

ولقد حظى موضوع تجفيف وتخزين الأجنة الجسمية باهتمام بالغ من قبل الباحثين، إلا أن تغليف الأجنة فى صورة بذور صناعية لم يصل إلى نفس المستوى من التقدم.

ولمزيد من التفاصيل عن موضوع تغليف الأجنة والبذور الصناعية .. يراجع Redenbaugh وآخرون (١٩٩١).

خصائص الأجنة الجسمية المعلقة ومحددات استعمالها كبذور صناعية

إن من أهم خصائص الأجنة الجسمية افتقارها إلى كل من الإندوسبرم والغلاف البذرى اللذان يتكونان بصورة طبيعية فى البذور الحقيقية. كذلك فإن تلك الأجنة الجسمية تكون صغيرة للغاية إلى درجة لا يمكن معها تداولها فى الزراعة أو ضمان نجاح زراعتها ولذا . يتعين تغليف تلك الأجنة بقالب من الإندوسبرم الصناعى يمكن أن يوفر لها حماية، ودعمًا غذائيًّا أثناء الإنبات.

ولقد استخدم لهذا الغرض جل ألجينات الكالسيوم calcium alginate gels، بالإضافة إلى كل من أوكسيد البوليثيلين، والشيتوسان chitosan.

وبينما يمكن أن يوفر جل الجينات الكالسيوم حماية للجنين، فإن فائدته فى توفير الدعم الغذائى له أثناء إنباته تعد محدودة للغاية.

هذا ويمكن للنشا – الذى يعد أحد أهم مكونات الإندوسبرم، وخاصة فى النباتات وحيدة الفلقة – أن يوفر كلا من الحماية والدعم الغذائى للجنين الجسمى فى البذور الصناعية، لكن يعيبه أنه أكثر نعومة من كل من الجرليت Gerlite والآجار، وألجينات الكالسيوم، الأمر الذى يؤدى إلى انطمار الجنين فى بيئة النشا. وللتغلب على تلك المشكلة يمكن خلط النشا بمواد جيلاتينية أكثر صلابة منه مثل الأجاروز agarose والجرليت (Sorvari وآخرون ١٩٩٧).

التطبيقات فى مجال حفظ الجيرمـبلازم

أهمية حفظ الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة

تسهل المحافظة على جيرمبلازم الأنواع التى تتكاثر جنسيًا على صورة بذور. أما حفظ جيرمبلازم الأنواع التى تتكاثر خضريًا . فهو أمر باهظ التكاليف؛ نظرًا لأنه يتطلب تواجد الجيرمبلازم ناميًا على الدوام فى حالة الأنواع المعمرة؛ كالتفاح والكمثرى، أو تجديد زراعتها سنويًا فى حالة الأنواع الحولية منها كالبطاطس هذا فضلاً على صعوبة المحافظة عليها خالية دائمًا من الإصابات الفيروسية أما حفظ هذه الأنواع على صورة بذور فإنه يؤدى إلى تغيرات وراثية كبيرة فى السلالات المحتفظ بها، ولا يفيد سوى فى المحافظة على"الجينات" المهمة التى توجد بكل من هذه السلالات

لأجل ذلك .. اتجه تفكير مربى النبات نحو مزارع الأنسجة لحفظ سلالات وأصناف الأنواع الخضرية التكاثر. وهو ما يحقق المزايا التالية:

١ — حفظ أعداد كبيرة من السلالات فى مساحة صغيرة للغاية بالمختبر، مع توفير النفقات التى تتطلبها زراعة وخدمة هذه السلالات فى الحقول، وتوفرها على مدار العام

٢ — بقاء السلالات المخزنة خالية من جميع الإصابات المرضية، خاصة الفيروسية منها

٣ — يمكن استخدام المزارع المحفوظة كتقاوى نواة لإكثارها وإنتاج أعداد كبيرة منها فى أى وقت حسب الحاجة

٤ — سهولة نقل مزارع السلالات من دولة إلى أخرى، نظرًا لخلوها من الإصابات المرضية

إن أهم الأمور التى تجب مراعاتها عند حفظ الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة هو تجنب تكرار زراعتها على فترات قصيرة، حتى لا تتعرض للإصابات الميكروبية، أو للأخطاء البشرية ويتحقق هذا الهدف بحفظ المزارع إما مجمدة وإما مبردة

هذا .. ويحفظ الجيرمبلازم إما لفترات قصيرة تمتد من سنة واحدة إلى أربع سنوات، وإما لفترات غير محدودة فى النيتروجين السائل على −١٩٦أم

يفيد التخزين لفترات قصيرة في الحد كثيرًا من تكلفة حفظ الجيرمبلازم، ويجرى بخفض كل من درجة الحرارة وشدة الإضاءة، وتعديل بيئات الزراعة (وخاصة فيما يتعلق بزيادة الضغط الأسموزى أو مثبطات النمو).

هذا .. إلاّ أنه لا توجد — حاليًّا — مجموعات للجيرمبلازم قائمة بالكامل على مزارع الأنسجة، وإن كانت هذه التقنية قد استخدمت على نطاق واسع فى حفظ الكثير من جيرمبلازم الأجناس *Solanum*، و *Fragaria*، و *Ipmoea*، و *Mentha*، و *Prunus*، و *Vaccinium*.

أما التخزين لفترات غير محدودة فى النيتروجين السائل فما يزال فى الدور التجريبى بالنسبة لغالبية الأنواع النباتية، ولكنه أصبح روتينيًّا فى نباتات محدودة، وخاصة أجناس: *Rubus*، و *Pyrus*، و *Solanum*، و *Elaeis* (عن McCown ٢٠٠٣).

حفظ المزارع بالتبريد

يمكن حفظ المزارع فى درجات حرارة منخفضة، تتراوح بين ١ و ٩°م، يعمل هذا المجال الحرارى على إبطاء تدهور النسيج النباتى، ولكنه لا يمنعه. ويعنى ذلك ضرورة إعادة زراعة النسيج على فترات متباعدة نسبيًّا. وتستخدم هذه الطريقة — حاليًا — فى تخزين جيرمبلازم الفراولة، وعديد من نباتات الفاكهة مثل التفاح والعنب.

ومن أمثلة حالات حفظ الجيرمبلازم بالتبريد، ما يلى (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣):

النوع النباتى	فترة التخزين	مدى احتفاظ المزرعة بحيويتها (٪)
Fragaria × ananassa	٧٢ شهرًا	١٠٠
F. virginiana	٧٢ شهرًا	١٠٠
F. vesca	٧٢ شهرًا	١٠٠
Lolium multiflorum	١٠–١١ شهرًا	٨٨–١٠٠
Lotus corniculatus	شهر واحد	٩٠
Malus domestica	١٢ شهرا	١٠٠
Medicago sativa	١٥–١٨ شهرا	٩٤–٩٥

النوع النباتى	فترة التخزين	مدى احتفاظ المزرعة بحيويتها (%)
Rubus sp.	١٤ شهرًا	٩٥
Trifolium pratense	١٥–١٨ شهرًا	٧٠–٨٦
T. repens	١٥–١٨ شهرًا	٨٩–٩٢
	١١ شهرًا	٩٠–١٠٠
Vitis vinifera	١٢ شهرًا	؟

حفظ المزارع بالتجميد الفائق (التخزين الكريوجينى)

يعنى بالتخزين الكريوجينى التخزين فى حرارة تنخفض إلى –١٣٠°م أو أقل من ذلك وهى تعد طريقة آمنة وفعالة لتخزين الجيرمبلازم لفترات غير محدودة، سواء أكانت على صورة بذور، أم حبوب لقاح، أم أجنة، أم براعم، أم مزارع أنسجة وبينما قد لا يكون تخزين البذور فى الحرارة الشديدة الانخفاض اقتصاديًا (حيث يمكن تخزينها بفاعلية على حرارة –٢٠°م)، فإن تخزين مزارع الأنسجة يعد ضمانًا للمحافظة على جيرمبلازم السلالات الخضرية التى قد تتعرض للفقدان إذا ما استلزم الأمر إكثارها سنويًا. وعلى الرغم من إمكان تخزين مزارع البروتوبلاست ومزارع الخلايا فى الحرارة الشديدة الانخفاض، فإنها لا تخزن بصورة روتينية بتلك الطريقة

كذلك يمكن تخزين السلالات الخضرية — على صورة أجنة جسمية — فى الحرارة الشديدة الانخفاض، علمًا بأن الأجنة الجسمية لا تختلف عن الأجنة الجنسية فى القدرة على تحمل تلك الظروف التخزينية. ويعنى ذلك إمكان حفظ جيرمبلازم السلالات الخضرية التكاثر كما يحفظ الجيرمبلازم البذرى (عن Towill ٢٠٠٢)

تعتبر مزارع الأعضاء النباتية مثل مزارع القمة النامية، ومزارع الأجنة، ومزارع الإكثار الدقيق هى أنسب المزارع للحفظ بالتجميد الفائق للأسباب التالية:

١ – تجنب وجود أية اختلافات وراثية عند بدء التخزين، وهو الأمر الذى قد يحدث فى مزارع الكالس ومعلقات الخلايا.

٢ — تجنب التغيرات الوراثية الكثيرة، التى يمكن حدوثها فى مزارع الكالس، ومزارع معلقات الخلايا خلال فترة التخزين الطويلة.

٣ — تحتفظ مزارع الأعضاء بقدرتها على استمرار النمو لتكوين نباتات جديده خلال فترة التخزين، بينما تفقد الخلايا فى مزارع الخلايا قدرتها على إنتاج النباتات الجديدة (أى تفقد خاصية الـ totipotency) خلال فترات التخزين الطويلة هذا فضلا على أن مزارع الخلاي لم يمكن دفعها لإنتاج النموات الخضرية فى عديد من الأنواع النباتية

٤ — يمكن المحافظة على الحالة الأحادية فى النباتات الأحادية بسهولة وهى على صورة مزارع القمم الميرستيمية والبراعم الإبطية، بينما لا تبقى السلالات على الحاله الأحادية فى مزارع الكالس

٥ -- تكون خلايا القمم النامية والأجنة (وهى خلايا ميرستيمية) أكثر قدره على تحمل عمليتى التجميد والتفكك

وقد استخدمت طريقة التجميد الفائق فى حفظ الجيرمبلازم لفترات تجريبية قصيرة نسبيًا (تراوحت من خمس دقائق إلى شهرين) فى عدة أنواع نباتية، وكان منها الجزر، والفراولة، والطماطم، والتبغ، والبسلة، والبطاطس، والذره، ويلاحظ أن معظم هذه الأنواع تتكاثر جنسيًا. ولكنها تتميز بأن تقنيات مزارع القمم الميرستيمية أو مزارع الأجنة قد قطعت فيها شوطًا كبيرًا، إلى درجة سمحت بتجربة استخدامها فى تطوير تقنيات حفظها بالتجميد (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

ويبين جدول (٦—٤) أمثلة لبعض الأنواع النباتية التى نجح فيها تخزين الأنسجة الميرستيمية على -١٩٦أم.

جدول (٦-٤): أمثلة على التخزين الفائق البرودة (-١٩٦م) للأنسجة الميرستيمية فى بعض النباتات الاقتصادية (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

المحصول	الجزء المخزن	تحضير الجزء المخزن وطريقة التجميد	القدرة على البقاء، والنمو، وتجديد النمو
الأسبرجس	القمة الخضرية	٤٪ DMSO، و ٣٪ جلوكوز لمدة ٣ أيام، ثم التجميد البطئ حتى -٤٠م، ثم فى النيتروجين السائل	بقاء (حياة) بنسبة ١٠٠٪ وتجديد كامل للنمو النباتى
التفاح	القمة الخضرية	تقسية لمدة ٢٠ يوم على -٣م	بقاء بنسبة ١٠٠٪ وتجديد نمو بنسبة ٧٥٪
الوز	خلايا جنينية	المعاملة بتركيز ٦٪ مانيتول لمدة ٢-٧ أيام، ثم التجميد البطئ حتى -٤٠م، ثم التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٥٠٪
الموالح	أجنة جسمية	التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٩٠٪
	أجنة جسمية	تجميد بطئ حتى -٤٠م، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٣٠٪
الكاسافا	القمة الخضرية	١٠٪ جليسرول و ٥٪ سكروز، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ١٣٪
الحمص	القمة الخضرية	٤٪ DMSO لمدة ٢٤ ساعة، ثم تجميد بطئ حتى -٤٠م، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٤٠٪
البسلة	القمة الخضرية	١٠٪ جليسرول، و ١٠٪ سكروز لمدة ١٥ دقيقة، ثم التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء بنسبة ١٠٠٪ وتجديد نمو بنسبة ٦٠٪
البطاطس	النموات البرعمية للدرنات	٢-٧٪ DMSO لمدة يومين، ثم التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ١٠-٢٠٪
قصب السكر	كالس	١٠٪ DMSO، و ٠,٥ مولار سوربيتول، ثم تجميد بطئ حتى -٤٠م، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٩٧٪

هذا .. ويحتفظ — حاليًا — بعدد من سلالات الجيرمبلازم لبعض الأنواع الخضرية التكاثر، مجمدة على صورة مزارع قمة خضرية، فى دول مختلفة، كما يلى (عن Reed ٢٠٠٢):

النوع المحصولى	الدولة (والمؤسسة)[أ]	تقنية التجميد[ب]	عدد السلالات/والمكررات
التفاح	الصين (CI)	CF/E-D	٢٠ سلالة/٥٠ قمة خضرية لكل منها
البلاكبرى	الولايات المتحدة (NCGR)	CF	١٧ سلالة/١٠٠ قمة خضرية لكل منها
الكاسافا	كولومبيا (CIAT)	E-D	٩٥ سلالة/٣٠ قمة خضرية لكل منها
حشيشة الدينار	الولايات المتحدة (NCGR)	CF	سلالتان/١٠٠ قمة خضرية لكل منها
الكمثرى	الولايات المتحدة (NCGR)	CF	١٠٦ سلالات/١٠٠ قمة خضرية لكل منها
البطاطس	ألمانيا (DSM/FAL)	Droplet	٢١٩ سلالة/٤٠–٣٥٠ قمة خضرية لكل منها
	بيرو (CIP)	Vit	١٩٧ سلالة/٢٥٠ قمة خضرية لكل منها
الكشمش/عنب الثعلب	اسكوتلندا (UAD)	E-D	٣١ سلالة/٢٥–٣٠ قمة خضرية لكل منها

أ – المؤسسات:

CI: Changli Institute of Pomology.
NCGR: National Clonal Germplasm Repository, Corvallis.
CIAT: International Center for Tropical Agriculture.
DSM/FAL: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelkulturen/Institute fur Pflanzenbau. Buundesforsch-ungsanstalt fur Landwirtschaft.
CIP: International Potato Center.
UAD: University of Abertay-Dundee.

ب – التقنيات:

CF: Controlled freezing.
E-D: Encapsulation-dehydration.
Vit: Vitrification.

يستخدم في التبريد الفائق مركبات تقوم بحماية المزارع من الحرارة الشديدة الانخفاض

وتُقسم تلك المركبات التي تحمي المزارع والأنسجة النباتية من التبريد الفائق (الـ cryoprotectants) – إلى ثلاث فئات – حسب مدى قدرتها على توفير تلك الحماية – كما يلي (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢)،

١ - مركبات توفر حماية قليلة وتشمل:

Dimethyl acetamide	Acetyl glycine
Mannitol	Glucosamine

٢ – مركبات توفر حماية متوسطة .. وتشمل:

Dimethyl urea	Acetyl choline
Hydroxyproline	Glutamic acid
	Methyl acetamide

٣ – مركبات توفر حماية عالية .. وتشمل:

Dimethyl sulfoxide	Betaine
Glucose	Ethylene glycol
Glycerol	Glyceraldehyde
Sucrose	Sorbitol

ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات مزارع الأنسجة في حفظ الجيرمبلازم .. يراجع Morel (١٩٧٥)، و Henshaw وآخرون (١٩٨٠، و ١٩٨٣)، و Withers (١٩٨٠، و ١٩٨٣)، و Bajaj (١٩٩٥)، وحسن (٢٠٠٥).

مصادر إضافية

للإطلاع على مزيد من التفاصيل فى موضوع الإكثار الدقيق .. يراجع ما يلى:

المرجع	الموضوع
Murashige (١٩٧٤)	الإكثار الدقيق
Hussey (١٩٨٠)	الإكثار الدقيق
Ingram & Helgeson (١٩٨٠)	إنتاج نباتات خالية من الفيروسات
Bottino (١٩٨١)	الإكثار الدقيق لمحاصيل الخضر
Evans وآخرون (١٩٨١)	تجديد النمو من مزارع الخلايا
Wetherell (١٩٨٢)	الإكثار الدقيق
Hussey (١٩٨٣)	الإكثار الدقيق
Hartmann & Kester (١٩٨٣)	الإكثار الدقيق للمحاصيل البستانية
George (١٩٨٦)	الإكثار الدقيق للبطاطس
Dhawan (١٩٩٣)	الإكثار الدقيق للأنواع الخشبية
Paranjothy (١٩٩٣)	الإكثار الدقيق لأنواع النخيل
Prakash وآخرون (١٩٩٣)	إنتاج نباتات خالية من الإصابات المرضية فى مزارع الأنسجة
Cassells (١٩٩٨)	إنتاج نباتات خالية من الإصابات المرضية



الفصل السابع

مزارع النباتات الأحادية المجموعة الكروموسومية

تمهيد

إن الهدف الرئيسى من إنتاج مزارع النباتات الأحادية المجموعة الكروموسومية haploids هو الاستفادة من تلك النباتات فى برامج التربية، وذلك بعد مضاعفتها والحصول منها على نباتات أحادية مضاعفة double haploids.

وعلى الرغم من أن نظام إنتاج النباتات الأحادية المضاعفة قد وصف لنحو ٢٠٠ نوع نباتي .. إلاّ أن النظام الذى يتبع بنجاح بصورة روتينية لا يوجد سوى فى عدد قليل نسبيًا من الأنواع النباتية، مثل:

Hordeum vulgare
Brassica oleracea
Gerbera jamesonii
Nicotiana spp.
Lolium perenne
Beta vulgaris
Triticum aestivum
Asparagus officinalis
Brassica napus
Datura innoxia
Zea mays
Solanum tuberosum
Oryza sativa
Triticale

هذا .. وتعد زراعة المتوك وحبوب اللقاح هى أكثر التقنيات استعمالاً فى إنتاج النباتات الأحادية المضاعفة فى معظم الأنواع النباتية، حيث تشكل أكثر من ٥٠٪ من الحالات التى دُرست.

وللتدليل على مدى انتشار مزارع المتوك وحبوب اللقاح التى تستخدم فى الحصول على نباتات أحادية (التوالد الذكرى) قُدِّر أنه — حتى عام ٢٠٠٢ — كان قد نشر أكثر من ٢٠٠٠ بحث فى الموضوع تناولت بالدراسة أكثر من ٢٥٠ نوعًا نباتيًا، كانت الباذنجانيات والأسبرجس من أهمها (عن McCown ٢٠٠٣).

إن المبدأ الأساسى فى ظاهرة التوالد الذكرى androgenesis هو وقف تطور خلية حبة اللقاح – التى تنتهى بتكوين جاميطة مذكرة – ودفعها نحو النمو المباشر لتكوين نبات كامل منها وهذا النمو غير الطبيعى لحبة اللقاح يمكن تحقيقه إذا ما أخذت خلية حبة اللقاح بعيدًا عن بيئتها الطبيعية فى النبات، ووضعت فى ظروف أخرى خاصة

كذلك لجأ الباحثون إلى مزارع المبايض ومزارع البويضات (التوالد الأنثوى gynogensis) لأجل إنتاج النباتات الأحادية المضاعفة فى عدد من الأنواع النباتية، مثل

Gerbera jamesonii	*Beta vulgaris*
Cucumis melo	*Cucmis sativus*
Helianthus annuus	*Allium cepa*

وقد اتبعت طريقة التهجينات الجنسية أو النوعية – التى تعقبها عملية استبعاد تلقائى للكروموسومات chromosome elemination فى الأجنة النامية – اتبعت فى إنتاج نباتات أحادية فى كل من الشعير، والقمح، والبطاطس، والقطن.

وحديثًا أصبحت مزارع الخلايا الجرثومية الصغيرة المعزولة isolated microspore culture أفضل وأكفا وسيلة لإنتاج نباتات أحادية مضاعفة من كل من الشعير، ولفت الزيت، ونباتات صليبية أخرى (عن Maluszynski وآخرين ١٩٩٦، و McCown ٢٠٠٣)

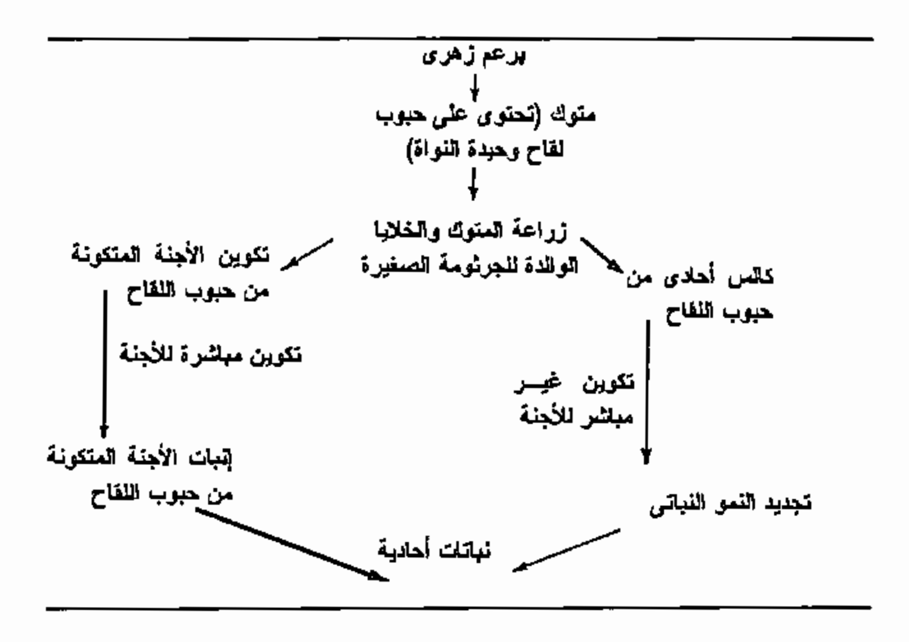
مزارع المتوك، وحبوب اللقاح، والخلايا الوالدة للجراثيم الصغيرة

خطوات تكوين النباتات الأحادية

أولاً: مزارع المتوك وحبوب اللقاح

تعد مزارع المتوك Anther culture من أكثر الطرق شيوعًا لإنتاج النباتات الأحادية ولقد تم تطوير هذه التقنية – لأول مرة – على نبات الداتورة بواسطة كل من Guha & Maheshwari فى عام ١٩٦٤. وفى هذه الطريقة .. يتم أولا جمع البراعم الزهرية وهى فى مرحلة مناسبة من التكوين من نباتات جيدة النمو. توضع البراعم فى أكياس

بلاستيكية على ٤م لمدة ٧–١٠ أيام، فيما يعرف بمعاملة البرودة. يلى ذلك تعقيم البراعم الزهرية سطحيًا باستعمال ٠.١٪ كلوريد زئبق HgCl لمدة ٩–١٠ دقائق، ثم تفصل المتوك تشريحيًا بعناية من البراعم وتنقل إلى بيئة الزراعة، وتحضن على ٢٥ ± ١م تحت إضاءة غير مباشرة. نجد غالبًا أن المتوك المزروعة تنتج كالس بعد ٢–٦ أسابيع، وبعد نحو شهر من تكوين الكالس فإنه يُحفَّز إلى تجديد النمو (شكل ٧–١).



شكل (٧–١): رسم تخطيطى يوضح عملية إنتاج النباتات الأحادية من خلال المتوك وما تحتويه من حبوب اللقاح وخلايا والدة للجراثيم الصغيرة **microspores**.

ويوضح شكل (٧–٢) مزيدًا من التفاصيل عن كيفية إنتاج النباتات الأحادية من حبوب اللقاح .. إما من خلال تكوين الأجنة pollen embryogensis، وإما من خلال كالس حبوب اللقاح pollen callusing (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

ثانيًا: مزارع الخلايا الجرثومية لحبوب اللقاح

تعتبر زراعة الخلايا الجرثومية – المفصولة – لحبوب اللقاح isolated microspores (الخلايا الجرثومية الصغيرة) أفضل من زراعة المتوك الكاملة. لأنها لا تعطى أى فرصة

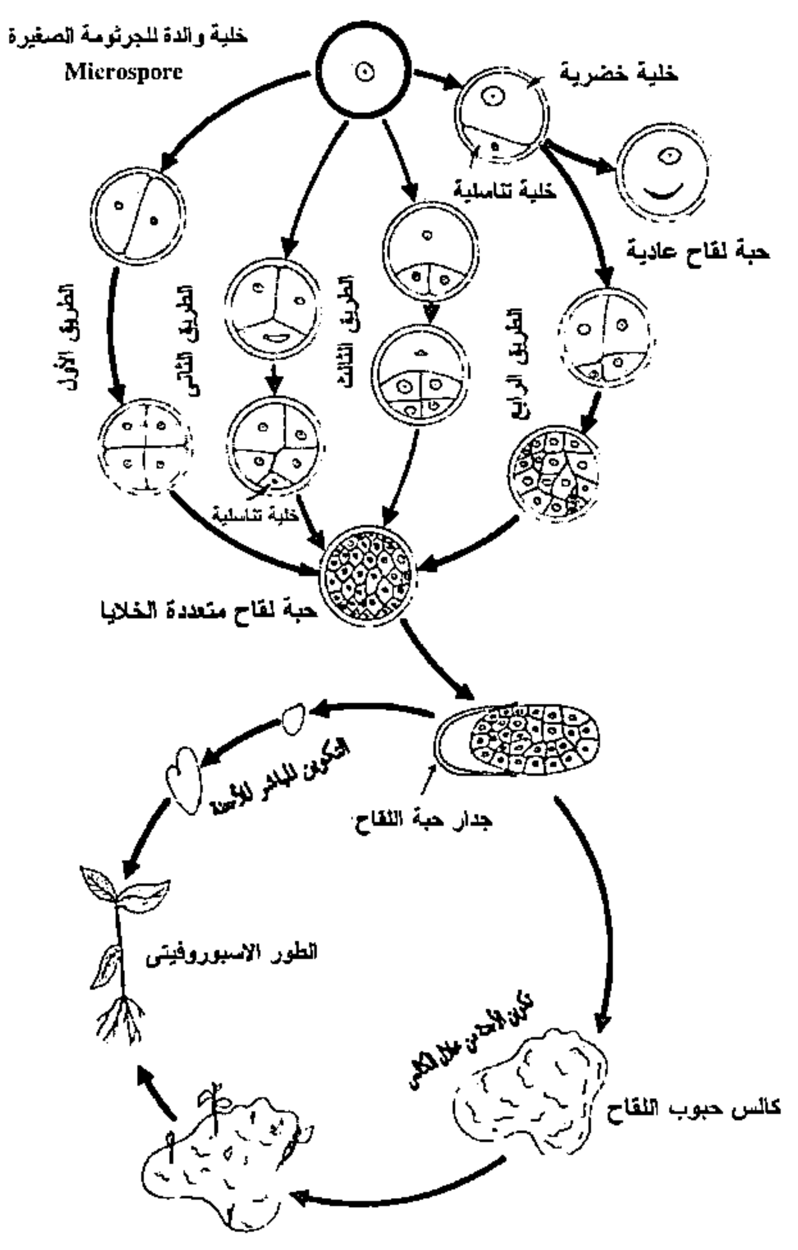
لظهور نباتات ثنائية العدد الكروموسومى، وهى التى قد تنشأ من خلايا جدر المتوك والأنسجة الرابطة بها وتنفصل الخلايا الجرثومية إما بصورة طبيعية بعد زراعة المتوك، وإما ميكانيكيًا بالضغط على المتوك حتى تبرز منها الخلايا الجرثومية

تمر الخلايا الجرثومية microspores — بعد زراعتها — بأشكال مختلفة من تجديد النمو — ذكريًا androgenesis – تقود إلى تكوين الأفراد الأحادية إما بصورة مباشرة، وإما بصورة غير مباشرة من خلال تكوين الكالس، علما بأن الطريق الأول يعد أفضل من الثاني بالنسبة للمربى

وعلى الرغم من أن تجديد النمو ذكريًا يمكن أن يحدث فى المزارع فى مرحلة الخلايا الأحادية الرابوع tetrad، أو فى مرحلة حبة اللقاح ذات النواتين (الذكرية والخضرية) فإن الخلايا الجرثومية الصغيرة microspores — فى مرحلة ما قبل الانقسام الميوزى الأول مباشرة أو عنده — هى الأفضل لتجديد النمو.

فى حالة تجديد النمو ذكريًا بصورة مباشرة تتطور الخلايا الجرثومية الصغيرة كما لو كانت زيجوتًا، حيث تمر بشتى مراحل تكوين الجنين كتلك التى تحدث بعد التلقيح والإخصاب وبعد وصول الأجنة إلى المرحلة الكروية globular stage فإنها تنطلق غالبا — من الجدار الخارجي لحبة اللقاح exine لتكمل نموها خارجيًا ويلى ذلك امتداد الفلقتين وبروز النبت الصغير من المتوك فى خلال ٤–٨ أسابيع

أما فى حالة تجديد النمو غير المباشر فإن الخلايا الجرثومية الصغيرة تنقسم عدة مرات لتكون كالس يندفع خارجًا من جدار المتك ويعقب ذلك إما تميز الكالس لتكوين أجنة أو جذور ونموات خضرية فى البيئه ذاتها، وإما أن ينقل إلى بيئة أخرى ليحدث التميز وغالبا ما تحتوى النباتات المتحصل عليها من الكالس على تباينات وراثية، وخاصة تلك التى يكون مردها إلى التعدد الكروموسونى، ولذا . فإنها لا يكون مرغوبا فيها (عن Bajaj ١٩٩٠).



شكل (٧-٢): تخطيط يبين نشأة النباتات الأحادية من حبوب اللقاح فى مزارع المتوك. يمكن أن تسلك الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة، أيا من الطرق الأربعة المبينة فى الشكل لتكوين حبة لقاح متعددة الخلايا، وهى التى يمكن أن تنتج بدورها جنينًا مباشرة، أو تنتج الطور الأسبورفيتى من خلال النمو الكالوسى.

العوامل المؤثرة فى عملية التوالد الذكرى

تتأثر عملية التوالد الذكرى androgensis بالعوامل التالية:

١ — التركيب الوراثى للبنات الذى تؤخذ منه المتوك المستعملة فى الزراعة

تظهر تباينات وراثية كبيرة بين الأجناس والأنواع، وحتى بين أصناف النوع الواحد فى استجابتها لزراعة المتوك. ولقد اقترح أن تلك الصفة يتحكم فيها جينات يمكن نقلها إلى التراكيب الوراثية التى تستجيب لزراعة المتوك

وللتدليل على مدى تأثر القدرة على تجديد النمو ذكريًا بالتركيب الوراثى داخل النوع النباتى الواحد وجد عندما استعمل ٤٣ صنفًا من الطماطم، و ١٨ سلالة من *Arabidopsis thaliana* أنه لم تنتج نباتات أحادية سوى من ثلاثة تراكيب وراثية من كل نوع. وقد حصل على نتائج متقاربة لتلك النتائج مع كل من أجناس محاصيل التبغ، والبطاطس، والراى (الجاودار) rye وفى القمح *Triticum aesativum* لم يُحصل على أنسجة أحادية إلاَ من ١٠ أصناف من بين ٢١ صنفًا استعملت فى الدراسة، ولم تختلف النتائج كثيرًا عما تقدم بيانه فى جنس محصول الأرز، وإن تباينات الأنواع فى هذا الشأن

ويبدو أن أحد الأسباب التى تكمن وراء فشل البعض فى الحصول على نباتات أحادية من مزارع المتوك أن الباحثين يقصرون عملهم على صنف واحد. ويتوقفون عن متابعة المحاولة إن لم ينجح هذا الصنف معهم. وإنه لمن المهم عمل حصر يتضمن عديدا من الأصناف، مع استخدام بيئات بسيطة؛ لأن البيئات المركبة الغنية فى منظمات النمو قد تحفز نمو خلايا جسمية من أنسجة المتوك.

هذا ومن المعلوم أن تجديد النمو ذكريًا صفة وراثية؛ ولا يوجد ما يمنع اختلاف أصناف النوع الواحد فى محتواها من الجين أو الجينات المسئولة عن تلك الخاصية ويمكن نقل تلك القدرة على تجديد النمو من التراكيب الوراثية الأكثر استجابة إلى التراكيب الأقل استجابة؛ وهو أمر تحقق بالفعل فى كل من البطاطس، والقمح (عن Bajaj ١٩٩٠)

٢ — الحالة الفسيولوجية للنبات الذى تؤخذ منه المتوك المستعملة فى الزراعة

تكون الأزهار الأولى فى التكوين أكثر نجاحًا فى مزارع المتوك. فضلا عن تأثر نجاح

الزراعة بعديد من العوامل التى تؤثر فسيولوجيًا على النبات الذى تؤخذ منه المتوك المستعملة فى الزراعة مثل عمره، والفترة الضوئية، وشدة الإضاءة، ودرجة الحرارة، والفترة من السنة، وحالة التغذية .. إلخ.

٣ — مرحلة تكوين الخلايا الأمية لحبوب اللقاح:

تعتبر المرحلة التى تتكون فيها الخلايا الأمية لحبوب اللقاح microspores — عند زراعة المتوك — من أهم العوامل التى تتحكم فى نجاح زراعة المتوك، وهى مرحلة تختلف باختلاف الأنواع النباتية، لكن تعتبر المرحلة المناسبة فى عديد من الأنواع هى عندما تحتوى المتوك على حبوب لقاح فى وقت مبكر إلى متوسط من مرحلة النواة المفردة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢). وبعبارة أخرى .. يجب أن يكون المتك فى مرحلة يحتوى فيها على خلايا جرثومية تتباين من مرحلة التكوين الرباعى tetrad إلى مرحلة اللقاح الثنائى النواة binucleate، علمًا بأنه بمجرد بدء ترسيب النشا فى الخلية الجرثومية فإنها لا تتطور أبدًا إلى نمو نباتى أحادى (عن Chawla ٢٠٠٠).

٤ — معاملات المتوك السابقة لزراعتها (الصدمات الحرارية والمعاملات الكيميائية):

تجرى معاملات للمتوك بهدف وقف التطور الطبيعى لحبوب اللقاح إلى جاميطة مذكرة، مثل:

أ — المعاملة بالحرارة المنخفضة، والتى تتراوح عادة بين ٣، و ٦ْم لمدة ٣-١٥ يومًا

ب — المعاملة بالحرارة العالية، مثل ٣٠ْم لمدة ٢٤ ساعة، أو ٤٠ْم لمدة ساعة واحدة.

جـ — المعاملة ببعض المركبات الكيميائية، مثل الإثريل بتركيز ٤٠٠٠ جزء فى المليون

تعرف معاملات الحرارة المنخفضة والمرتفعة باسم الصدمات الحرارية.

من أمثلة الصدمات الحرارية المعاملة بالبرودة (٤-١٠ْم لمدة أسبوع) أو الحرارة (٣٥ْم لمدة ٥-١٥ دقيقة)، حيث تؤدى تلك المعاملات إلى وقف عمل الجينات المسئولة عن التكوين الطبيعى للطور الجاميطى.

لقد تمكن العلماء منذ عام ١٩٢٢ من الحصول على نباتات أحادية العدد

الكروموسومى من الداتورة بتعريض النباتات لحرارة منخفضة وقت إخصاب الأزهار، كما أمكن الحصول على نباتات أحادية من التبغ فى عام ١٩٣٧ بتعريض النباتات لأى من الحرارة العالية أو المنخفضة وأعقب ذلك فى عام ١٩٣٩ الحصول على نباتات أحادية من الشوفان بتعريضها لحرارة ٣ْم وفى كل هذه الحالات كانت نشأة النباتات الأحادية من البويضات

وأمكن الاستفادة من تأثير الصدمة الحرارية بتطبيقها فى مزارع المتوك على كل من الطماطم، والتبغ، حيث أسفرت عن تحفيز تجديد النمو ذكريًا من كل من المتوك وحبوب اللقاح المعزولة. ويبدو أن تأثير الحرارة المنخفضة (٣-٥ْم) هو تأثير غير مباشر حيث إنها تبقى على حيوية حبوب اللقاح لفترة أطول، مما يؤخر شيخوختها، ويمنع إجهاضها، ومن ثم يزداد عدد حبوب اللقاح التى يمكن أن تكوّن أجنة (عن Bajaj ١٩٩٠)

كذلك يوقف التعريض للحرارة المنخفضة العمليات الأيضية بحبة اللقاح،وإذا ما استمرت المعاملة لفترة كافية، فإن ذلك يجعل حبة اللقاح تغير من أيضها العادى إذا ما وضعت بعد المعاملة فى بيئة خاصة، حيث تعطى فى أول انقسام لها — حينئذ — نواتين متماثلتين بدلا من تكوين نواة خضرية وأخرى تناسيلية تختلف المدة التى تلزم للتعريض للحرارة المنخفضة باختلاف الأنواع النباتية (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢، جدول ٧-١)

٥ — تركيب بيئة الزراعة:

قد يؤثر تركيب بيئة الزراعة على استجابة المتوك للزراعة، ومن أهم البيئات الأساسية المستعملة لهذا الغرض: N_6، و MS، و B_5، و Nitsch & Nitsch

تعد بيئة موراشيج وسكوج مناسبة لزراعة حبوب اللقاح وعلى الرغم من عدم أهمية العناصر والفيتامينات فى حث عملية التوالد الذكرى، فإن لها أهمية كبيرة فى تطور تكوين الجنين بعد ذلك، وللحديد المخلبى — خاصة — أهمية كبيرة فى تميز الأجنة فى مرحلة النمو الكروى وحتى طور النمو القلبى أما منظمات النمو فيتعين تجنب تواجدها فى مزارع المتوك وحبوب اللقاح

جدول (٧-١): معاملات الحرارة المنخفضة التى أخضعت لها المتوك أو البراعم الزهرية – قبل استخدامها فى مزارع المتوك – لأجل زيادة معدل التولد الذكرى androgensis – من المتوك المزروعة – فى أنواع نباتية مختلفة (عن Mantell وآخرين ١٩٨٥).

النوع النباتى	المعاملة السابقة للزراعة
Brassica campestris (اللفت)	٣ أيام على ٣٥°م
B. napus (لفت الزيت)	١٤ يومًا على ٣٠°م
Datura innoxia	٤ أيام على ٤°م
D. metel	يومان على صفر°م
Festuca arundinacea (الفِكرش)	٢٥ يومًا على ٥°م
Hordeum vulgare (الشعير)	يومان على ٣°م
Nicotiana tabacum (التبغ)	١٢ يومًا على ٧-٨°م
Oryza sativa (الأرز)	١٠ أيام على ١٣°م
Petunia hybrida (البيتونيا)	يومان على ٦°م
Secale cereale (الراى)	٦-١٠ أيام على ٦°م
Triticum aestivum (القمح)	٢-٨ أيام على ٣-٥°م
T. aestivium x *T. cereale* (الترتيكيل)	٧ أيام على ٤°م
Vitis sp. (العنب)	٣ أيام على ٤°م
Zea mays (الذرة)	١٤ يومًا على ٨°م
	وكذلك ٧ أيام على ٤°م ثم ٧ أيام على ٨°م

هذا .. وتعد البيئات السائلة أكثر مناسبة لمزارع المتوك وحبوب اللقاح، حيث يتحفز تكوين الأجنة فيها (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

٦ – الضوء:

بينما يحفز الظلام والضوء الأزرق عملية التوالد الذكرى، فإن الضوء الأبيض يعد مثبطًا لها. هذا بينما يقلل الضوء الأحمر الوقت الذى يلزم لإنتاج نباتات من حبوب اللقاح بنحو ٢٠٪ (عن Chahal ٢٠٠٢).

٧ – مستوى التضاعف فى النباتات الناتجة من مزارع المتوك:

قد يحدث تضاعف ذاتى للكروموسومات أثناء النمو الكالوسى للخلايا الأمية لحبوب اللقاح، مما يؤدى إلى إنتاج نباتات أحادية متضاعفة بصورة مباشرة، وهو أمر يتفاوت معدل حدوثه بين الأنواع النباتية، وحسب ظروف الزراعة. كذلك قد تنمو من الكالس

نباتات ثنائية عادية (ليست أحادية متضاعفة) عندما تتكون بعض خلايا الكالس من خلايا جدر المتوك الثنائية (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

بيئات الزراعة

استخدمت فى مزارع المتوك البيئات الأساسية لكل White، ومورواشيج سكوج Murashuge and Skoog، و Nitsch & Nitsch مع تحويرات طفيفة وإضافات لمنظمات النمو، علمًا بأن المدى الطبيعى للسكروز يتراوح فى هذه البيئات بين ٢٪، و ٤٪ (جدول ٧-٢) كذلك يبين جدول (٧-٣) تركيبًا لبيئة استخدمها Nitsch لزراعة الخلايا الأمية لجراثيم التبغ الصغيرة.

يلعب الحديد فى البيئة دورًا هامًا جدًّا ولا غنى عنه وعلى الرغم من أن تجديد النمو ذكريًا يمكن أن يبدأ فى مزارع التبغ فى غير وجود الحديد، إلا أن مبادئ الأجنة المتكونة proembryos لا تتطور لأكثر من الطور الكروى. ويعد الحديد المخلوب، مثل FeEDTA، و FeEDDHA أكثر كفاءة -- كمصدر للحديد — عن سترات الحديد

وتعد الاحتياجات الغذائية للمتوك المفصولة والمزروعة أكثر بساطة من تلك التى تلزم الخلايا الجرثومية الصغيرة المعزولة، نظرًا لغياب كثير من العوامل التى تستحث تجديد النمو فى تلك الخلايا، بينما نجد أنها قد تتوفر فى المتوك، والتى يدخل ضمنها محتوى المتوك الطبيعى من كل من الأوكسين والسيتوكينين.

هذا وتتباين الأنواع النباتية فى احتياجاتها الدقيقة من مختلف مكونات البيئة، كما تتباين متطلبات تجديد النمو المباشر عن تلك التى يحدث فيها تجديد النمو غير المباشر ويعد السكر جزءًا أساسيًا من مكونات البيئة، حيث لا يشكل فقط مصدرا للكربون، ولكنه يفيد — كذلك — فى عملية التنظيم الأسموزى، فعلى الرغم من أن المدى الطبيعى لمحتوى السكر فى البيئة يجب أن يتراوح بين ٢٪، و ٤٪، فإن زيادة نسبة السكر فى البيئة إلى ٦٪ حتى ١٢٪ أعطى نتائج أفضل فى كل من القمح، والشعير، والأرز، والبطاطس، ويبدو أن تلك الاستجابة كان مردها إلى تأثير المحتوى العالى للسكر على الضغط الأسموزى، وليس بسبب أى حاجة إلى مستوى عالٍ من المواد الكربوهيدراتية فى البيئة

جدول (٧–٢): مكونات بعض البيئات الأساسية فى مزارع المتوك (مجم/لتر).

	White	Murashige and Skoog	Nitsch and Nitsch	N_6
العناصر الكبرى				
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	٢٨٨	—	—	—
KNO_3	٨٠	١٩٠٠	٩٥٠	٢٨٣٠
NH_4NO_3	—	١٦٥٠	٧٢٠	—
KCl	٦٥	—	—	—
KH_2PO_4	—	١٧٠	٦٨	٤٠٠
$NaH_2PO_4.4H_2O$	١٩	—	—	—
$CaCl_2.2H_2O$	—	٤٤٠	١٦٦	١٦٦
$MgSO_4.7H_2O$	٧٣٧	٣٧٠	١٨٥	١٨٥
Na_2SO_4	٢٠٠	—	—	—
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	—	٤٦٣
العناصر الصغرى				
$Fe_2(SO)_3$	٢,٥	—	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	—	٢٧,٨	٢٧,٨	٢٧,٨
Na_2.EDTA	—	٣٧,٣	٣٧,٣	٣٧,٣
$MnSO_4.4H_2O$	٦,٧	٢٢,٣	٢٥	٤,٤
H_3BO_3	١,٥	٦,٢	١٠	١,٦
$ZnSO_4.4H_2O$	٢,٢	٨,٦	١٠	١,٥
KI	٠,٧٥	٠,٨٣	—	٠,٨
$Na_2MoO_4.2H_2O$	—	٠,٢٥	٠,٢٥	—
$CuSO_4.5H_2O$	—	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥	—
$CoCl_2.6H_2O$	—	٠,٠٢٥	—	—
مركبات عضوية				
Biotin	—	—	٠,٠٥	—
Glycine	٣,٠	٢,٠	٢	٢
Inositol	—	١٠٠	١٠٠	—
Nicotinic acid	٠,٥	٠,٥	٥	٠,٥
Pyridoxine-HCl	٠,١	٠,٥	٠,٥	٠,٥
Thiamine-HCl	٠,١	٠,١	٠,٥	٠,٥
Folic acid	—	—	٥	—
Sucrose	٢٠٠٠٠	٣٠٠٠٠	٢٠٠٠٠	٥٠٠٠٠

جدول (٧-٣): تركيب بيئة استخدمها Nitch فى زراعة الخلايا الأمية للأبواغ الدقيقة فى التبغ (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

المكونات	التركيز (مجم/لتر)
KNO_3	٩٥٠
NH_4NO_3	٧٢٥
$MgSO_4.7H_2O$	١٨٥
KH_2PO_4	٦٨
$CaCl\ 2H_2O$	١٦٦
Fe EDTA	٥ مل
جلوتامين Glutamine	٧٣٠
سيرين Serine	١٠٥
إينوزيتول Inositol	٤٥٠٥
سكروز	٢٠٠٠٠
رقم الحموضة (pH)	٥,٨

كذلك أدت إضافة الفحم النباتى إلى البيئة إلى تحفيز النمو ذكريًا فى مزارع متوك التبغ، والبطاطس، والشوفان، والجزر وعلى الأقل فى التبغ كان مرد التأثير المحفز للفحم النباتى فى مزارع التبغ إلى امتصاص الفحم للمركب 5-hydroxymethyfurfural الذى يتكون أثناء تعقيم السكروز فى الأوتوكليف. وهو مركب له تأثير ضار؛ أى إن الفحم النباتى يمتص المركبات المثبطة، ومن ثم يقلل أعداد الأجنة الأحادية التى كانت عرضة للإجهاض فى وجود تلك المركبات (عن Bajaj ١٩٩٠) هذا فضلاً عن امتصاص الفحم للمركبات السامة التى تنتج عن تحلل التوك، ومثبطات النمو — مثل حامض الأبسيسك — التى تتواجد بتركيزات عالية فى المتوك وتمنع عملية التوالد الذكرى (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢)

خطوات الزراعة

يجب أن تؤخذ المتوك المستعملة فى الزراعة من نباتات حديثة الإزهار، ويكون ذلك فى مرحلة معينة من تكوين حبوب اللقاح قبل تفتح الزهرة؛ لذا .. فإنه تفضل دائمًا زراعة النباتات التى تؤخذ منها المتوك فى ظروف بيئية متحكم فيها، ليمكن الربط — إلى حد ما — بين المظهر الخارجى للبرعم الزهرى، والمرحلة المناسبة لتكوين حبوب اللقاح

تعد البراعم الزهرية المغلقة المتحصل عليها فى بداية مرحلة الإزهار – والتى توجد بها المتوك فى مرحلة الخلايا الجرثومية الوحيدة النواة – هى الأفضل للاستخدام فى مزارع المتوك وحبوب اللقاح. تقطع تلك البراعم الزهرية، وتعقم سطحيًا – وهى فى مجموعات تضم كل منها ٢٥ برعمًا – وذلك باستعمال محلول ٥٪ من الكلوراكس أو ١٪ هيبوكلوريت الكالسيوم لمدة ١٠ دقائق، ثم تغسل مرتين باستعمال ماء معقم ومقطر.

فى البداية .. يتم عمل شق على أحد جوانب البرعم الزهرى، وتسحب الأسدية خارجيًا باستعمال ملقط ذات أطراف مدببة، وتجمع فى طبق بترى معقم. ويلى ذلك إزالة الخيوط بحرص من الأسدية، وتنقل كل خمسة متوك معًا إلى وعاء بيئة الزراعة، وذلك بعد اختبار مرحلة تكوينها بسحق أحد المتوك فى صبغة أسيتوكارمن .. ويراعى أثناء فصل المتوك عدم الإضرار بها إطلاقًا، حيث يتعين استبعاد جميع المتوك المضارة، نظرًا لأنها تعطى غالبًا نسيج كالس من أجزاء غير حبوب اللقاح – مثل جدر المتوك – وهى خلايا ثنائية.

تزرع المتوك على بيئة آجار فى أنابيب زجاجية، أو فى أطباق بترى صغيرة، كما يمكن – كذلك – زراعتها فى بيئة سائلة فى دوارق مخروطية مع وضعها فى هزاز دائرى بطئ الحركة. كذلك يمكن اتباع تقنية خاصة توضع فيها حبوب اللقاح على قطعة من ورقة ترشيح تستند على متك كامل يستند – بدوره – على بيئة الزراعة، فيما يعرف بالمزرعة الحاضنة nurse culture، التى توفر فيها المتوك بعض المركبات الأساسية التى تلزم لنمو حبوب اللقاح (شكل ٧–٣).

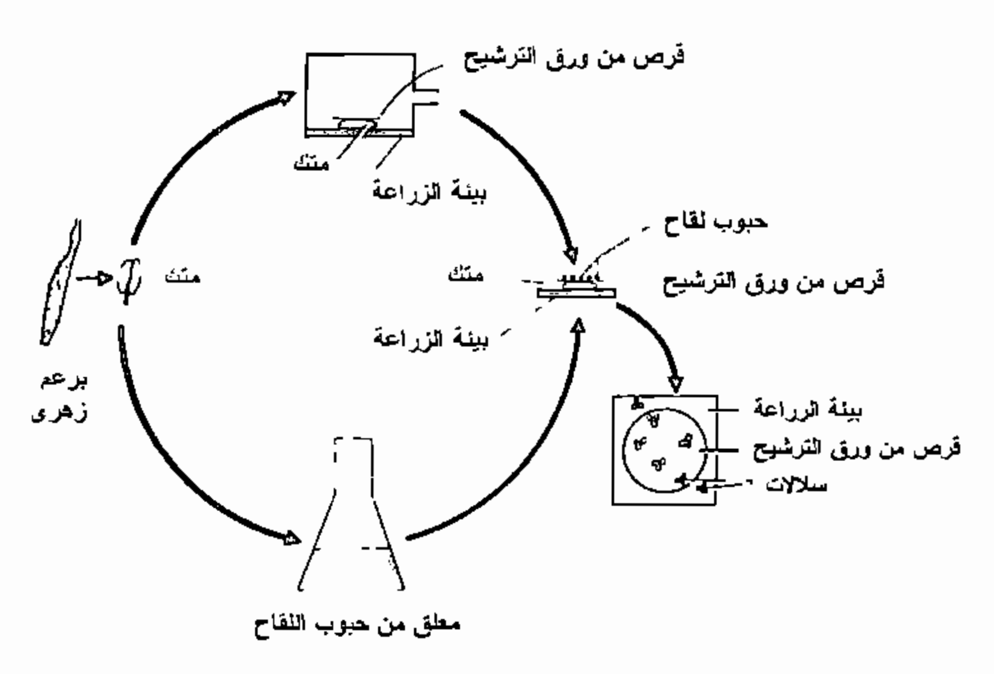
تحضن مزارع المتوك غالبًا فى الضوء (٥٠٠٠–١٠٠٠٠ لكس lux/م^2) لمدة ١٢–١٨ ساعة على حرارة ٢٨°م بالتبادل مع فترة إظلام، مدتها ٦–١٢ ساعة على حرارة ٢٢°م.

تتحول جدر المتوك – تدريجيًا – إلى اللون البنى، ثم تتفتح فى خلال ٣–٨ أسابيع، بسبب الضغط الداخلى للكالس المتكون من حبوب اللقاح، أو بسبب النباتات الصغيرة Plantlets التى تنمو منها.

تفصل النباتات المفردة أو النموات الخضرية عن الكالس، بعد أن يصل طولها إلى نحو

٣–٥ سم، وتنقل إلى بيئة مناسبة للنمو الجذرى، ويلى ذلك نقل النباتات التى تكون جذورها إلى أصص صغيرة معقمة وتحتوى على تربة معقمة ولتقليل الصدمات ومنع الجفاف يفضل تنكيس كأس زجاجى فوق كل نبات، مع وضع الأصص فى صوبة رطبة وجيدة الإضاءة

ترفع الكؤوس من على النباتات بعد حوالى أسبوع من الزراعة، ثم بعد نحو أسبوعين آخرين يتم نقلها مرة أخرى إلى أصص أكبر حجمًا، حيث تبقى فيها إلى حين اكتمال نموها وإزهارها (عن Bajaj ١٩٩٠)



شكل (٧–٣) تقنية المزارع الحاضنة **nurse culture technique** لإنتاج سلالات أحادية من مزارع حبوب اللقاح (عن **Bhojwani & Razdan ١٩٨٣**).

قوائم بالأنواع النباتية التى أمكن إكثارها

أولا: مزارع المتوك وحبوب اللقاح:

نستعرض – فيما يلى – قوائم ببعض الأنواع النباتية التى أمكن إكثار نباتات أحادية منها من خلال مزارع المتوك وحبوب اللقاح.

● قائمة Chu (١٩٨٢)، و Bhojwani & Razdan (١٩٨٣):

العائلة والنوع النباتى	طريقة التكوين[أ]
Caricaceae	؟
Carica papaya	؟
Chenopodiaceae	
Beta vulgaris	؟
Compositae	
Gerbera jamesonii	C
Cruciferae	
Arabidopsis thaliana	C
Brassica campestris	E
B. chinensis	؟
B. oleracea	C
B. oleracea x *B. alboglabra* (F_1)	C
B. napus	E
B. pekinensis	؟
Euphorbiaceae	
Hevea brasiliensis	؟
Geraniaceae	
Pelargonium hortorum	C
Gesneriaceae	
Saintpaulia ionantha	E
Gramineae	
Aegilops caudata x *A. umbellata*	C
Bromus inermis	C
Coix lacryma	؟
Hordeum vulgare	C
Lolium multiflorum	C
L. multiflorum x *Festuca arundinaceae*	C
Oryza sativa	C, E
O. perennis	C
Secale cereale	C, E
Setaria italica	C
Triticale	C

العائلة والنوع النباتى	طريقة التكوين[أ]
Triticum aestivum	C, E
T. durum	؟
T. vulgare x *Agropyron glaucum*	C
Zea mays	C, E
Hippocastanaceae	
Aesculus hippocastanum	E
Leguminosae	
Trifolium alexandrium	C
Liliaceae	
Asparagus officinalis	C
Lilium longiflorum	C
Ranunculaceae	
Paeonia hybrida	E
Rutaceae	
Poncirus trifoliata	E
Salicaceae	
Populus nigra	C
P. ussuriensis	C
P. simonii x *P. nigra*	C
Scrophulariaceae	
Digitalis purpurea	C
Solanaceae	
Atropa belladonna	E
Capsicum annum	C, E
Datura innoxia	E
D. metel	C, E
D. meteloides	E
D. muricata	E
D. Stramonium	E
D. wrightii	E
Hyoscyamus albus	E
H. niger	E, C

طريقة التكوين[أ]	العائلة والنوع النباتى
E	*H. pusillus*
E	*Lycium halimifolium*
C	*Lycopersicon esculentum*
E	*Nicotiana alata*
E	*N. attenuata*
E	*N. clevelandii*
E	*N. glutinosa*
E	*N. knightiana*
E	*N. langsdorffii*
E	*N. otophora*
E	*N. paniculata*
E	*N. raimondii*
E	*N. rustica*
E	*N. sanderae*
E	*N. sylvestris*
E	*N. tabacum*
E	*Petunia axillaris*
C	*P. hybrida*
C	*P. axillaris* x *P. hybrida*
E	*Scopolia carniolica*
E	*S. lurida*
E	*S. physaloides*
C, E	*Solanum bulbocastanum*
C, E	*S. demissum*
C, E	*S. dulcamara*
C, E	*S. fendleri*
E	*S. hjertingii*
C	*S. melongena*
C	*S. nigrum*
E	*S. phureja*
C, E	*S. polytrichon*

العائلة والنوع النباتى	طريقة التكوين[أ]
S. stenotomum	E
S. stoloniferum	E
S. surattense	C
S. tuberosum	C, E
S. verrucosum	C, E
S. verrucosum x *S. chacoense*	E
S. verrucosum x *S. tuberosum*	E

أ — E تكوين النباتات الأحادية من خلال التكوين الجنيني من حبوب اللقاح pollen embryogenesis، و C تكوين النباتات الأحادية من خلال النمو الكالوسي لحبوب اللقاح pollen callusing، و ؟ طريقة التكوين غير واضحة.

● قائمة Bajaj (١٩٩٠)

قدمت قائمة Bajaj حصرًا بالأنواع النباتية التى أمكن الحصول منها على كالس أحادى المجموعة الكروموسومية، أو أجنة أو نباتات أحادية عن طريق مزارع المتوك أو حبوب اللقاح. ومن بين الأنواع النباتية الهامة التى ورد ذكرها، ما يلى:

Asparagus officinalis	*Arachis* spp.
Brassica spp	*Beta vulgaris*
Cicer arietinum	*Capsicum* spp.
Daucus carota	*Coffea arabica*
Freesia spp.	*Fragaria* spp.
Gossypium spp.	*Gladiolus* spp.
Hordeum vulgare	*Helianthus annuum*
Lycopersicon spp.	*Jacaranda acutifolia*
Medicago sativa	*Malus domestica*
Phaseolus aureus	*Oryza sativa*
Populus spp	*Pisum sativum*
Secale cereale	*Psophocarpus tetragonolobus*
Triticum spp.	*Solanum* spp.
Vigna mungo	*Triticale*
Zea mays	*Vitis vinifera*

● قائمة Kalloo (١٩٨٨):

من بين محاصيل الخضر – والأنواع القريبة منها – التى أمكن الحصول فيها على أنسجة أو أجنة أو كالس أو نباتات كاتملة أحادية المجموعة الكروموسومية بالاستعانة بزراعة المتوك أو حبوب اللقاح، ما يلى:

Solanum tuberosum
S. verrucosum
S. melongena
Lycopersicon esculentum
Capsicum annuum
Asparagus officinalis
Pisum stivum
Phaseolus vulgaris
P. aureus
Vicia faba
Vigna unguiculata
Glycine max
Cucumis melo
Brassica oleracea var. *italica*
Brassica oleracea var. *gemmifera*

ثانيًا: مزارع الخلايا الوالدة للجراثيم الدقيقة:

من بين الأنواع النباتية التى أنتجت فيها أجنة embryos (E) أو نباتات كاملة plants (P) باستخدام مزارع الخلايا الوالدة للجراثيم (أو الأبواغ) الدقيقة microspore culture (مزارع الخلايا الجرثومية الصغيرة)، ما يلى (عن Dunwell ١٩٩٦):

Asparagus officinalis (P)
Brassica campestris (P)
Brassica carinata (P)
Brassica napus (P)
Brassica oleracea (P)
Camellia japonica (E)

Datura innoxia (P)
Ginkgo biloba (E)
Hordeum vulgare (P)
Lupinus albus (E)
Medicago sativa (E)
Nicotiana tabacum (P)
Oryza sativa (P)
Triticum aesativum (P)
Zea mays (P)

مزارع المبايض والبويضات

يُعرف إنتاج النباتات الأحادية من الخلايا الجرثومية الكبيرة megaspores باسم التوالد الأنثوى gynogensis، الأمر الذى يتم عن طريق مزارع المبايض ovary culture، وهى التى أجريت بداية على الذرة والباذنجان، ثم طبقت على محاصيل أخرى مثل الأرز والشعير ولقد وجدت تباينات وراثية فى تكوين الكالوس الـ gynogenic. ويتوقف نجاح الزراعة — كذلك — بصورة أساسية على مرحلة تكوين المبيض التى تتباين المرحلة المناسبة منها باختلاف الأنواع فيما بين مرحلة البويضة الأحادية النواة إلى مرحلة الكيس الجنينى المكتمل التكوين ويعد توفر منظمات النمو التى تحفز التوالد الأنثوى وسبط تضاعف الأنسجة الأمية أمرا حيويًا لنجاح زراعة المبايض، ومن أهم منظمات النمو المؤثرة فى ذلك الاتجاه 2-methyl, 4-chlorophenoxyacetic acid (اختصارًا MCPA).

وتعد مزارع المبايض أقل كفاءة فى إنتاج النباتات الأحادية من مزارع المتوك، نظرًا لوجود كيس جينيي واحد بكل مبيض، مقارنة بآلاف الخلايا الجرثومية لحبوب اللقاح التى قد تتواجد فى المتك الواحد

هذا . ويمكن أن تزرع المبايض ملقحة أو غير ملقحة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

ولقد نجحت مزارع المبايض غير الملقحة والبويضات فى كثير من الأنواع النباتية.

مثل *Beta vulgaris*، و *Allium cepa*، و *Gerbera jamesonii*، وهى أنواع يصعب فيها التوالد البكرى الذكرى androgensis، ولا تُعرف لها وسيلة أخرى لإنتاج النباتات الأحادية ويبين جدول (٧-٤) نسبة النباتات الأحادية - من بين تلك التى يتجدد نموها - من كل من مزارع المبايض ومزارع البويضات لعدد من الأنواع النباتية.

تتشابه طريقتا زراعة المبايض والبويضات، لكن زراعة المبايض تكون أبسط، حيث لا يتطلب الأمر فصل البويضات كما فى حالة مزارع البويضات، كما تقل احتمالات الإضرار بالبويضات فى حالة المبايض. كذلك فإن مرحلة نمو وتكوين العضو المزروع تكون أقل أهمية فى مزارع المبايض. هذا .. إلاّ أن مزارع البويضات قد تكون هى الأفضل فى حالة الأنواع النباتية التى تكثر البويضات فى مبايض أزهارها (عن Keller & Korzun ١٩٩٦)

جدول (٧-٤): نسبة النباتات الأحادية بين النباتات التى يتجدد نموها من مزارع البويضات ومزارع المبايض فى ستة أنواع نباتية (عن **Keller & Korzun ١٩٩٦**).

النوع النباتى	نوع المزرعة	النسبة المئوية للنباتات الأحادية من بين تلك التى تجدد نموها^أ
Allium cepa	مبايض	٨٨,٣
	مبايض وبويضات	٦٢,٢
	مبايض	٧٠
Beta vulgaris	بويضات	٣٦,٩
	بويضات	٩٠,٧
	بويضات	٨١
Helianthus annuus	مبايض	٥٤
Gerbera jamesonii	بويضات	٤٢
	بويضات	٧٦
Lilium davidii	مبايض	٦٥,٧
Oryza sativa	مبايض	٧٧,٥

أ - أخذت النتائج نقلا عن دراسات مختلفة.

وأمكن عن طريق مزارع المبايض ovary culture الحصول على نباتات أحادية فى عديد من الأنواع النباتية، من أمثلتها ما يلى (عن Bajaj ١٩٩٠):

Gerbera jaesonii	*Beta vulgaris*
Hordeum vulgare	*Helianthus annuus*
Oryza sativa	*Nicotiana tabacum*
Zea mays	*Triticum aestivum*

ويعد الأرز من أهم المحاصيل الزراعية التى تمت الاستفادة فيه من مزارع المبايض فى إنتاج النباتات الأحادية.

عزل الأجنة الأحادية فى التهجينات البعيدة

تعتمد خاصية تكوين الأجنة الأحادية فى التهجينات البعيدة على الاستبعاد التلقائى للهيئة الكروموسومية الكاملة لأحد النوعين المهجنين خلال مرحلة تكوين الجنين فى البيئات الصناعية.

ومن أشهر الأمثلة على ذلك الحصول على نباتات أحادية من الشعير *Hordeum vulgare* بعد تهجينه مع النوع البرى *H. bulbosum*، فيما يعرف باسم الـ bulbosum method (شكل ٧-٤) نجد أن كروموسومات النوع الأخير تُستبعد سريعا خلال المراحل المبكرة لتكوين الجنين، ولكن يتدهور تكوين الإندوسبرم - كذلك - بعد ٢-٥ أيام من نمو الجنين؛ الأمر الذى يتطلب عزل الجنين وزراعته فى بيئة صناعية لإكمال نموه وبهذه الطريقة يمكن الحصول على نباتات أحادية من الشعير

وقد نجحت هذه الطريقة - كذلك - فى الحصول على نباتات أحادية من القمح *Triticum aesativum* لدى تلقيح الصنف Chinese Spring بلقاح من النوع *H bulbosum*، ولكن نجاح تلك الطريقة فى القمح قاصر على أصناف القمح التى تحتوى على الجين kr المسئول عن استبعاد كروموسومات *H bulbosum* (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الحصول على الأجنة الأحادية بمعاملة الطور الجاميطى بالإشعاع

تؤدى معاملة حبوب اللقاح بجرعات عالية نسبيًا من الإشعاع - تكفى لقتلها - إلى إنتاج أجنة أحادية -- بالتوالد البكرى - عند استعمال تلك اللقاح فى تلقيح النباتات،

وكانت تلك من أوائل الطرق التي استخدمت في إنتاج نباتات أحادية، وقد طبقت بنجاح في عديد من الأنواع النباتية، مثل:

Cucumis melo	*Petunia hybrida*
Lilium speciosum	*Tradescantia paludosa*
Pseudostuga menziesi	*Populus trichocarpa*
Pyrus communis	*Nicotiana tabacum*
Allium cepa	*Theobroma cacao*
Rosa hybrida	*Malus domestica*

(عن Maluszynski وآخرين ١٩٩٦)

Hordeum vulgare ($2n = 2x = 14$, VV) × *Hordeum bulbosum* ($2n = 2x = 14$, BB)

F_1 zygote
$2n = 2x = 14$ (7V+7B)

مزارع الأجنة

استبعاد لكروموسومات البلبوزم (- 7B)

Haploids of *H. vulgare*
($2n = x = 7$V)

مضاعفة الكروموسومات — Chromosome doubling

Doubled haploids of *H. vulgare*
($2n = 2x = 14$ VV)

شكل (٧-٤): طريقة البلبوزم **bulbosum method** لإنتاج نباتات أحادية مضاعفة من الشعير.

وقد استخدمت أشعة إكس بنجاح في كل من الأنواع التالية:

Nicotiana rustica	*Capsicum frutescens*
Triticum durum	*Triticum aestivum*
	Triticum monococcum

واستخدمت أشعة جاما فى كل من الأنواع التالية:

Cucumıs melo | *Allium cepa*
Malus domestica | *Hordeum vulgare*
Rosa hybrida | *Petunia hybrida*

كما استخدمت النظائر المشعة ^{32}P ، و ^{35}P فى النوع *Trıticum aesatıvum* (عن Sestilı & Fıccadentı ١٩٩٦).

ويحد من اتباع تلك الطريقة فى إنتاج النباتات الأحادية ارتفاع نسبة الأجنة التى لا تكمل نموها ولا يمكنها الإنبات، الأمر الذى يمكن التغلب عليه باللجوء إلى مزارع البويضات ومزارع الأجنة.

كذلك تؤدى معاملة الطور الجاميطى الأنثوى female gametophyte (الكيس الجنينى) بالإشعاع قبل التلقيح بحبوب لقاح غير معاملة بالإشعاع إلى إنتاج نباتات أحادية من حبوب اللقاح. حدث ذلك فى عدد من الأنواع النباتية، مثل:

Antırrhınum majus | *Crepıs tectorum*
Petunıa spp.

(عن Maluszynskı وآخرين ١٩٩٦).

إنتاج النباتات الأحادية المضاعفة

نجد عند المستوى الأحادى (١ ن) أن كل جين يكون ممثلاً مرة واحدة hemızygous وبعد مضاعفة الكروموسومات يصبح — نظريًا — كل جين ممثلاً مرتين، أى يصبح كل جين homozygous. وبذا يكون النبات الأحادى المضاعف أصيلاً تمامًا.

هذا .. ويشار أحيانًا إلى النباتات الأحادية المضاعفة doubled haploıds بأنها أحادية ثنائية dıhaploıds، إلاّ أن التعريف الكلاسيكى للنباتات الأحادية الثنائية أنها النباتات الأحادية (١ ن = ٢س) للنباتات الرباعية التضاعف (٢ن = ٤س). ولذا يوصى بعدم استخدام مصطلح الـ dihaploıds فى وصف النباتات الـ double haploids (عن Khush & Vırmanı ١٩٩٦)

وتتم مضاعفة النباتات الأحادية – لإعادتها إلى الحالة الثنائية العدد الكروموسومى – إما بمعاملتها بالكولشيسين، وإما عن طريق مزارع الكالس للنباتات الأحادية.

وتجرى المعاملة بالكولشيسين بأى من الطرق التالية:

١ – بمعاملة النباتات الصغيرة الناتجة من مزارع المتوك – وهى مازالت متصلة بالمتوك – بالكولشيسين بتركيز ٠,٥٪ لمدة ٢٤–٤٨ ساعة، ثم غسلها جيدًا وإعادة زراعتها.

٢ – زراعة المتوك – مباشرة – على بيئة تحتوى على كولشيسين لمدة أسبوع – أى لحين بدء الانقسام الخلوى الأول – ثم نقلها إلى بيئة لا تحتوى على أى كولشيسين (شكل ٧–٥).

٣ – معاملة البراعم الإبطية (محاور الأوراق) فى النباتات الأحادية بعجينة من اللانولين المحتوى على الكولشيسين بتركيز ٠,٤٪.

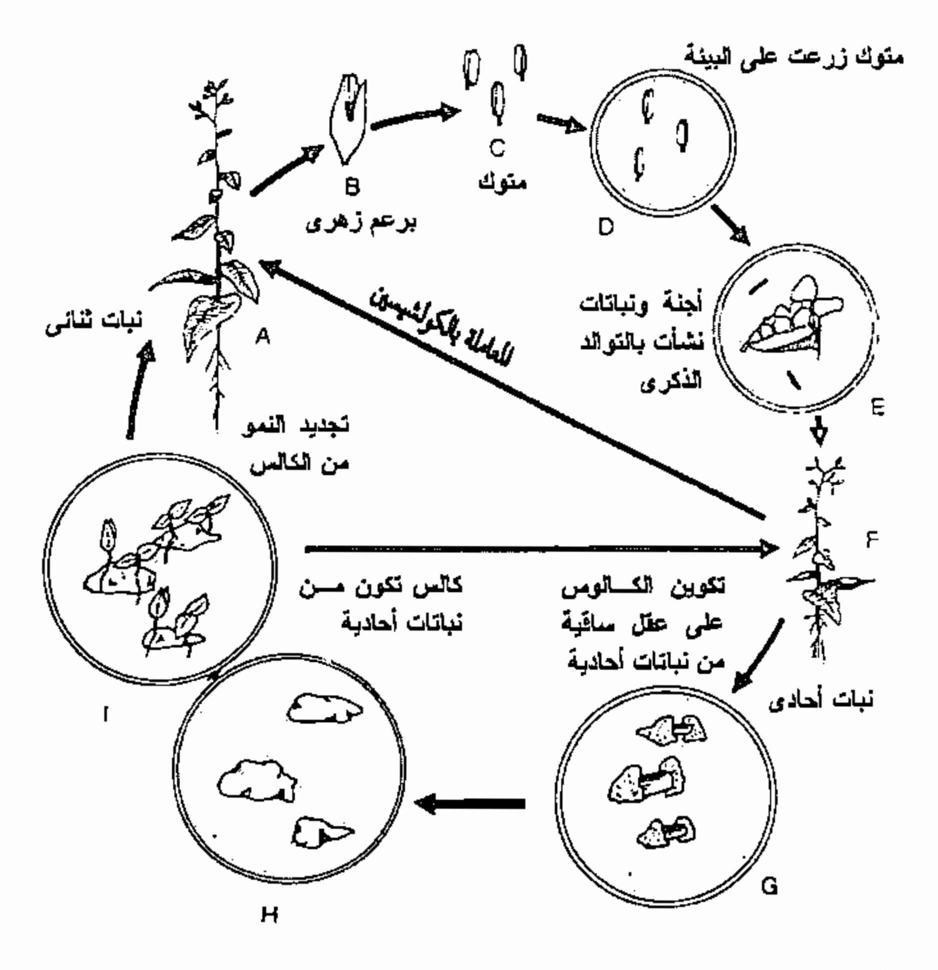
٤ – تكرار معاملة البراعم الإبطية للنباتات الأحادية بالقطن المبلل بالكولشيسين لمدة ١٠–١٤ يومًا (عن Chawla ٢٠٠٠).

ويبين جدول (٧–٥) معاملات الكولشيسين التى تجرى بهدف إحداث التضاعف فى مختلف أنواع مزارع الأنسجة.

أما مزارع الكالس الأحادى المجموعة الكروموسومية فيمكن الحصول عليها بزراعة عقل ساقية لنباتات أحادية فى بيئة تحفز إنتاج الكالس (شكل ٧–٥). ومن المعروف أن مزارع الكالس الأحادى المجموعة الكروموسومية كثيرًا ما تمر خلاياها بانقسامات ميتوزية للنواة فقط (endomitosis)، الأمر الذى يمكن استغلاله فى الحصول على نباتات ثنائية أصيلة. وفى تلك الحالات تزرع قطعة صغيرة من ساق النبات الأحادى فى بيئة تحتوى على أوكسين وسيتوكينين لحث تكوين الكالس (عن Bajaj ١٩٩٠).

جدول (٧-٥) معاملات الكولشيسين بهدف إحداث التضاعف في نباتات مزارع الأنسجة (عن Rao & Suprasanna ١٩٩٦).

النوع النباتي	المزرعة	تركيز الكولشيسين (جم/لتر)	مدة المعاملة	التأثير
Atropa belladona	مزارع خلايا أحادية	١,٠	٢٤ ساعة	مضاعفة ٧٠٪ من الخلايا
Brassica napus	جذور نباتات المزارع	٠,٠٥	٤-٨ أيام	مضاعفة ٥٠٪ من الخلايا
	مزارع الأبواغ الدقيقة	٠,١-٠,٠٢٥	٦-٧٢ ساعة	استجابة إيجابية على تكوين الأجنة في ٦٩٪ من الحالات
Nicotiana tabacum	نباتات صغيرة في المزارع	٤,٠	٤ ساعات	تضاعف بنسبة ٦٠٪
Oryza sativa	مزارع المتوك	٠,٥-٠,٢٥	٢٤-٤٨ ساعة	٣١-٦٥٪ نباتات أحادية مضاعفة
Saccharum officinarum	مزارع خلايا الأوراق	٠,٥-٠,٠٥	٤ أيام	٥٣,٥٪ نباتات أحادية مضاعفة
Solanum verrucosum	مزارع القمة الميرستيمية	٠,٥	٤٨ ساعة	نسبة عالية من التضاعف
Triticum aesativum	مزارع المتوك	٠,٢٥-٠,١٢٥	٤٨-٧٢ ساعة	تضاعف بنسبة ٨٩٪، مع تأثير ضار على النباتات
	مزارع الأبواغ الدقيقة	٠,٤-٠,١	٧٢ ساعة	نسبة عالية من النباتات الخصبة
	مزارع المتوك	٠,٢-٠,١	٣ أيام	٧٢٪ تضاعف
Zea mays	كالس جنيني أحادي	٠,٥-٠,٢٥	٢٤-٧٢ ساعة	٥٠٪ تضاعف



شكل (٧-٥): طرق إنتاج نباتات ثنائية أصيلة من نباتات أحادية حُصِل عليها من مزارع المتوك (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

هذا .. ولكى تكون عملية مضاعفة النباتات الأحادية ناجحة، فإنه يجب أن تتوفر فيها الشروط التى تجعل اتباعها اقتصاديًا مقارنة بالطرق الأخرى، وهى كما يلى:

١ — أن تكون سهلة وتعطى بانتظام أعدادًا كبيرة من النباتات الأحادية المضاعفة من كل التراكيب الوراثية فى برنامج التربية.

٢ — يجب أن تكون النباتات الأحادية المضاعفة طبيعية وثابتة وراثيًا.

٣ – يجب أن تمثل النباتات الأحادية المضاعفة عينة عشوائية من جاميطات الآباء (عن Khush & Virmani ١٩٩٦).

مزارع النباتات الأحادية كمصدر للتباينات الوراثية

الأساس الوارثى للتباينات

تظهر فى مزارع النباتات الأحادية العدد الكروموسومى تباينات وراثية لا حصر لها، يكون مرد بعضها إلى حالات التضاعف الكروموسومى غير التام aneuploidy، وبعضها الآخر إلى حالات من التضاعف الكروموسومى التام euploidy. والنوع الأخير هو الأكثر شيوعًا، ربما بسبب التأثيرات الضارة لعدم التوازن الجينى الذى يحدث فى حالات التضاعف الكروموسومى غير التام (جدول ٧–٦)

جدول (٧–٦): بيانات عن بعض الأنواع النباتية ذات القدرة العالية على إنتاج نباتات غير أحادية فى مزارع المتوك (عن **Bhojwani & Razdan ١٩٨٣**).

النوع (وعدد الكروموسومات الجسمى)	وسيلة تكوين النموات الجديدة	عدد كروموسومات النباتات المنتجة
Atropa belladonna (٧٢)	الأجنة	٣٦، ٧٢، ١٠٨
Datura innoxia (٢٤)	الأجنة	١٢، ٢٤، ٣٦، ٤٨، ٧٢
D. metel (٢٤)	الأجنة	١٢، ٢٤، ٣٦
D. meteloides (٢٤)	الأجنة	١٢، ٢٤
Hordeum vulgare (١٤)	كالس	٧، ١٤، ٢٨
Lotus corniculatus (٢٤)	كالس	٢٤، ٢٨
Oryza sativa (٢٤)	كالس	١٢، ٢٤، ٣٦، ٤٨، ٦٠
Petunia hybrida (١٤)	كالس جنينى	٧، ١٤، ٢١، ٢٨
Solanum nigrum (٧٢)	كالس	٣٦، ٧٢، ١٠٨، وتضاعفات غير تامة للمجموعة الكروموسومية aneuploids

وإلى جانب التغيرات فى أعداد الكروموسومات، فإن التباينات الوراثية التى قد تحدث فى مزارع المتوك يمكن أن تتضمن – كذلك – تغيرات على المستوى الجزيئى

(مستوى الدنا)، يمكن أن تؤدى إلى وقف فعل جينات كانت فى الأصل ذات تأثير ظاهر، أو ظهور تأثيرات لجينات كان تأثيرها مُثبطًا على الرغم من وجودها.

كذلك يمكن أن تظهر فى مزارع المتوك تباينات تنتج عن تغيرات وراثية سيتوبلازمية، والتى من أكثرها حدوثًا الفقد الجزئى أو الكلى لدنا البلاستيدات (عن Ziauddin & Kasha ١٩٩٠).

مصادر التباينات الوراثية

إن من أهم مصادر التباينات الوراثية التى تظهر فى مزارع النباتات الأحادية، ما يلى:

١ — التباينات الموجودة أصلاً:

تتواجد العديد من الخلايا المتضاعفة كروموسوميًا فى الجزء النباتى المزروع explant منذ البداية، ولعمر النسيج النباتى المستخدم ونوعه أهمية كبيرة فى هذا الشأن، حيث تزداد حالات التباينات تلك بزيادة عمر النسيج، وفى نسيج النخاع عما فى الأنسجة الميرستيمية بالقمة النامية.

وعندما يستخدم نسيج جسمى ثنائى لأجل إنتاج نباتات أحادية، فإن أحد مصادر التباينات قد تكون الطفرات.

٢ — التباينات التى تستحث للظهور فى أنسجة الكالس:

يعد ظهور الكالس بمثابة عكس لعملية التميز dedifferentiation، وفيها تُستحث عملية التضاعف الكروموسومى دون انقسام للخلايا endoreduplication، وتتشرذم الكروموسومات فى الخلايا المنقسمة، مما يؤدى إلى حالات التضاعف الكروموسومى غير التام.

٣ — طول مدة البقاء فى المزارع:

تؤدى كثرة دورات مزارع الأنسجة، أو طول فترة بقاء المزارع إلى زيادة معدل ظهور التباينات الوراثية (عن Ziauddin & Kasha ١٩٩٠).

وسائل التحكم فى ظهور التباينات الوراثية

يمكن التحكم فى ظهور التباينات الوراثية فى مزارع النباتات الأحادية بمراعاة ما يلى

١ -- اختيار الجزء النباتى المستعمل فى الزراعة (الـ explant) من نسيج ميرستيمى

٢ — اختيار بيئة مناسبة للزراعة، فمثلاً .. وجد أن الـ parafluorophenylalanine كان مفيدا فى المحافظة على مزارع الخلايا الأحادية ثابتة وراثيًا

٣ — اختيار الوقت المناسب لإعادة الزراعة:

من المعروف أن مزارع البيئات السائلة تعاد زراعتها كل ٧ أيام، بينما تعاد زراعة مزارع البيئات الصلبة كل أربعة أسابيع. وتؤدى إعادة الزراعة subculturing قريبا من قمة الدليل الميتوزى peak mitotic effect (وهو يحسب بقسمة عدد الأنوية التى تمر بانقسام ميتوزى على العدد الكلى للأنوية الملاحظ) إلى تأكيد تكوّن أعداد كبيرة من الخلايا الميرستيمية

٤ — المحافظة على المزارع فى ظروف مناسبة

تعد الظروف المناسبة هى التى تبطء نمو المزارع، مثل

أ — خفض درجة الحرارة إلى ما بين ٤، و ١٢°م.

ب — زيادة الضغط الأسموزى لبيئة الزراعة.

جـ - إضافة بعض مثبطات النمو مثل حامض الأبسيسك، والسيكوسيل.

د — التخزين فى ظروف الحرارة شديدة الانخفاض فى النيتروجين السائل على – ١٩٦°م (عن Ziauddin & Kasha ١٩٩٠).

استخدامات النباتات الأحادية فى مجال تربية

إن من أهم المزايا التى حققتها النباتات الأحادية، والنباتات الثنائية التى حُصل عليها بمضاعفة الأحادية، ما يلى

١ — تحقيق الأصالة الوراثية للجينات التى يصعب الوصول إليها بحالة أصيلة، كما فى آليلات عدم التوافق فى الراى (الجاوْدار) rye.

٢ — التخلص من ظاهرة عدم التوافق الذاتى فى عديد من محاصيل الفاكهة.

٣ – استخدام النباتات الأحادية كوسيلة لانتخاب الجاميطات، وللحصول على نباتات ثنائية أصيلة فى جيل واحد بدلاً من التربية الداخلية لستة أو ثمانية أجيال — كما حدث فى الشعير على سبيل المثال — ويستفاد من تلك السلالات فى إنتاج الهجن

٤ – التأكد من سلامة الانتخاب لأى صفة تم الانتخاب لها؛ إذ إن جميع الجينات تكون فى حالة أصيلة، ولا يمكن أن تحدث فيها أى انعزالات وراثية فى الأجيال التالية للجيل الانتخابى الأول.

٥ – نقل السيتوبلازم من سلالة لأخرى فى خطوة واحدة، ولذلك أهميته الكبيرة عند الرغبة فى نقل صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى إلى إحدى السلالات لاستخدامها كآباء للهجن

٦ – إجراء الدراسات الوراثية فى البطاطس على مستوى النباتات الثنائية العدد الكروموسومى.

٧ – إنتاج أصناف الأسبرجس المذكرة (كما سيأتى تفصيله فى نهاية هذا الفصل).

٨ – إنتاج الكثير من التباينات الوراثية (يراجع الموضوع السابق).

٩ – الاستفادة منها فى الدراسات السيتولوجية.

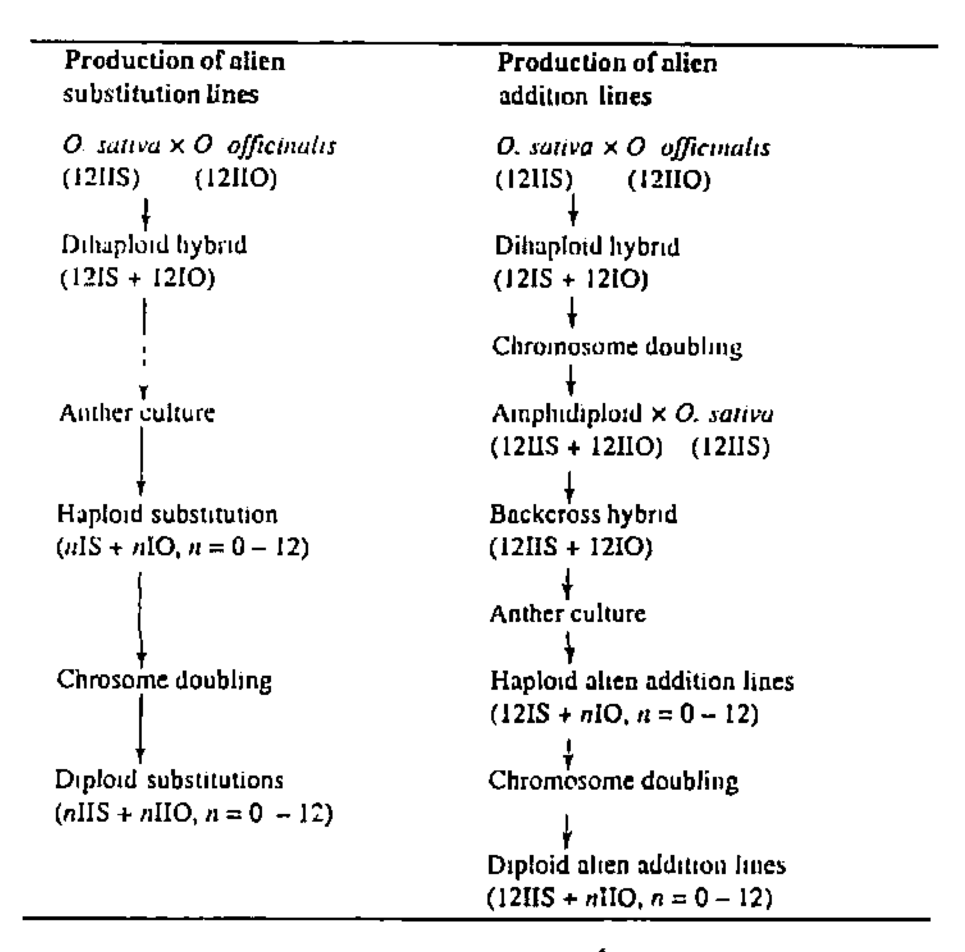
١٠ – الإنتاج المبكر للأصناف التجارية (يراجع الموضوع الأخير من هذا الفصل).

١١ – تشكل النباتات الأحادية مصدرًا مثاليًا للجيرمبلازم فى عمليات دمج البروتوبلاست.

١٢ – تستعمل مزارع المتوك فى الحصول على كل من alien substitution lines، و alien addition lines، كما يتبين من شكل (٧-٦) الذى استخدم فيه الأرز كمثال.

١٣ – تستعمل النباتات الأحادية المضاعفة – كذلك – فى التطوير السريع للعشائر نظرًا لسهولة إخضاعها للـ quantitative trait loci mapping، وعمل خرائط ارتباطية للصفات الهامة بها (عن Chawla ٢٠٠٠، و Chahal & Gosal ٢٠٠٢، و Taji وآخرين ٢٠٠٢)

١٤ – إنتاج مختلف حالات التعدد الكروموسومى غير التامة aneuploids (يراجع لذلك الموضوع السابق).



شكل (٧-٦): تخطيط لإنتاج كلاً من الـــ alien substitution lines(أ)، و الـــ alien addition lines (ب) من خلال مزارع المتوك فى الأرز.

١٥ – تعد النباتات الأحادية وسيلة سهلة لإنتاج النباتات ذات الأصول الوراثية المتشابهة isogenic lines (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

١٦ – إنتاج سلالات أحادية مضاعفة مماثلة فى قوة نموها وسلوكها لنباتات الجيل الأول: يتطلب تحقيق ذلك، ما يلى:

أ – إنتاج طفرات ثابتة من صنف قياسى تنتشر زراعته.

ب – تقييم تلقيحات الجيل الأول بين طفرات من هذا الصنف، أو بين الطفرات والصنف الأصلى؛ لأجل تحديد الهجن التى تتفوق فى محصولها على الصنف الأصلى

جـ – إنتاج أعداد كبيرة من السلالات الأحادية المضاعفة من هجن الجيل الأول التى تظهر بها قوة الهجين.

د – تقييم السلالات الأحادية المضاعفة المنتجة، لأجل انتخاب ما يتماثل منها فى قوة الهجين مع الجيل الأول.

هـ – التقييم الحقلى للسلالات الأحادية المضاعفة المنتجة.

وأهم ما يميز تلك السلالات التى تظهر بها قوة نمو مماثلة لقوة هجين الجيل الأول أنها تكثر بالتلقيح الذاتى. ولقد اتبعت هذه الطريقة – بالفعل – فى إنتاج أصناف جديدة محسنة من الشعير (عن Maluszynski وآخرين ١٩٩٦).

١٧ – سهولة وجدوى الانتخاب على مستوى النباتات الأحادية:

من المفضل أن يجرى الانتخاب للصفات المرغوب فيها فى النباتات الأحادية ذاتها قبل مضاعفتها، وذلك توفيرًا للجهد المبذول فى مضاعفة نباتات أحادية بغير ذى فائدة، علمًا بأن نتيجة الانتخاب تكون واحدة – تقريبًا – فى كل من النباتات الأحادية والأحادية المضاعفة، ففى إحدى الدراسات على الذرة .. أظهرت ٧٢٪ من الجينات التى تناولتها الدراسة صفاتها فى كل من حبة اللقاح والطور الاسبوروفيتى، بينما أظهرت ٢٢٪ من الجينات صفاتها فى الطور الاسبوروفيتى فقط، وأظهرت ٦٪ من الجينات صفاتها فى حبة اللقاح فقط. كما حُصل على نتائج مشابهة لتلك فى الطماطم

ولقد أظهر الانتخاب عند المستوى الأحادى جدواه – فى مزارع المتوك – لتحمل الملوحة فى الشعير، وفى مزارع الكالس لمقاومة الأمراض وزيادة كفاءة عملية البناء الضوئى فى التبغ (عن Khush & Virmani ١٩٩٦).

كذلك نجد فى طرق التربية التقليدية أن التباينات بين أفراد العشائر الانعزالية الأولى تتضمن تأثيرات إضافية وأخرى غير إضافية للجينات، بينما ترجع التباينات التى تظهر فى السلالات الأحادية المضاعفة double haploids – أساسًا – إلى تأثيرات إضافية للجينات وتفوق من النوع الإضافى × الإضافى الذى يسهل تثبيته فى دورة واحدة من الانتخاب ويؤدى التخلص من تأثير السيادة، مع توفر كميات كافية من البذور من كل سلالة أحادية مضاعفة – تسمح بإجراء الاختبارات بمكررات – يؤدى ذلك إلى زيادة

درجة التوريث للصفات فى تلك العشائر. ولذا . فإنه بالمقارنة بأحجام العشائر الكبيرة نسبيًا التى تلزم زراعتها وتقييمها فى طرق التربية التقليدية، فإن عدد السلالات الأحادية المضاعفة التى يلزم زراعتها بهدف انتخاب الانعزالات المرغوب فيهـ يكون أقل فمثلاً . يكفى فى الأرز زراعة ١٥٠ سلالة أحادية مضاعفة بدلاً من ٤٠٠٠-٥٠٠٠ نبات جيل ثانى لأجل انتخاب التراكيب الوراثية المرغوب فيها (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

١٨ — زيادة فرص تحقيق التقدم عند التربية بالطفرات

إن من أهم مميزات النباتات الأحادية المضاعفة بالنسبة للمربى — كما أسلفنا — سرعة الوصول إلى الأصالة الوراثية، وسهولة الانتخاب للصفات المرغوب فيها نظرًا لانعدام الانعزالات الوراثية فى نسل تلك النباتات. وإذا ما اقترنت التربية بالطفرات مع إنتاج النباتات الأحادية المضاعفة، فإن ذلك قد يؤدى إلى عزل الطفرات المتنحية بكفاءة عالية فى كل من المزارع والنباتات التى يتجدد نموها منها؛ مما يؤدى إلى سرعة تثبيت الطفرات فى صورة أصيلة كذلك فإن غياب الكيميرا فى الطفرات المنتجة يزيد من أهمية تلك الوسيلة فى التربية بالطفرات.

وتستخدم فى إنتاج الطفرات فى مزارع الأنسجة أى من العوامل المطفرة التى تستخدم فى إنتاج الطفرات فى النباتات، مثل: أشعة إكس، وأشعة جاما، والمركبات EMS (أو ethyl methanesulphonate)، و BMS (أو n-butyl methanesulphonate)، و MNH (أو N-methyl-N-nitroso urea)

كذلك يمكن معاملة مزارع البروتوبلاست الأحادى بالعوامل المطفرة، مثل الأشعة فوق البنفسجية، وأشعة إكس، وأشعة جاما، و ENH (أو N-ethyl-N-nitroso urea)، و MNNG (أو N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine)، وهى معاملات نجحت فى إنتاج طفرات فى عدد من الأنواع النباتية، منها:

Hyoscyamus muticans	*Datura innoxia*
Nicotiana sylvestris	*Nicotiana tabacum*

إن تقنيات النباتات الأحادية المضاعفة يمكن أن تكون مفيدة — ليس فقط فى سرعة

التوصل إلى طفرات بحالة أصيلة – وإنما كذلك فى التوصل إلى تراكيب وراثية مرغوب فيها من تلقيحات بين الطفرات، فمن الحقائق المعروفة ظهور قوة هجين فى الجيل الأول الناتج من التلقيح بين طفرتين مختلفتين. حيث تأكد ذلك فى عديد من الأنواع المحصولية، منها الشعير، والذرة، ولفت الزيت، والأرز، والسمسم، والبرسيم، والطماطم ويمكن لقوة الهجين تلك أن تظهر فى تلقيحات بين طفرات من نفس الصنف، أو تلقيحات بين الطفرات والصنف الأصلى غير المطفر. ولقد ظهرت قوة هجين جوهرية إحصائيًا فى صفات مثل المحصول ومكوناته، وارتفاع النبات، ومساحة الأوراق، وحجم الأزهار، وتكوين الخلفات، ومحتوى البذور البروتينى، والكفاءة التمثيلية، وتراوحت قوة الهجين فى بعض الصفات الهامة من ٣٠٪ إلى أكثر من ١٠٠٪ بالزيادة عن الصنف الأصلى وحتى الطفرات التى تبدو غير جيدة من الناحية الزراعية فإنها يمكن أن تعطى هجنًا متميزة. تتفوق فى محصولها على الصنف الأصلى

وتوفر النباتات الأحادية المضاعفة وسيلة فعالة لتثبيت قوة الهجين حينما تعتمد تلك الخاصية على الفعل المكمل أو الإضافى للجينات المطفرة. حيث يمكن – حينئذ – انتخاب نباتات أحادية مضاعفة أفضل من أى من أبويها، أو مماثلة للجيل الأول الهجين فى قوة الهجين (عن Maluszynski وآخرين ١٩٩٦)

١٩ – سهولة إجراء الدراسات الوراثية على النباتات الأحادية المضاعفة:

يفضل استخدام العشائر الأحادية المضاعفة فى الدراسات الوراثية لسبب رئيسى. وهو انخفاض عدد التراكيب الوراثية فيها عما يكون عليه الحال فى عشائر الجيل الثانى أو الجيل الرجعى؛ مما يعنى نسب أبسط من الأشكال المظهرية والتراكيب الوراثية، وهى التى يمكن تمييزها بقدر أكبر من التأكد (جدول ٧–٧) كذلك فإن وجود عدد أقل من فئات التراكيب الوراثية فى عشائر النباتات الأحادية المضاعفة عما فى عشائر الجيل الثانى يعنى إمكان عزل التراكيب الوراثية النادرة والتعرف عليها باستعمال عشائر نباتية أصغر حجمًا (جدول ٧–٨) ولذا . يتوقع – مستقبلا – استخداما أوسع للسلالات الأحادية المضاعفة فى الدراسات الوراثية، خاصة بالنسبة للصفات التى يتحكم فيها عديد من الجينات المتنحية (عن Pauls ١٩٩٦)

جدول (٧-٧) نسب الأشكال المظهرية فى الجيل الثانى والعشائر الأحادية المضاعفة لصفة يتحكم فيها عدد (ن) من الجينات ذات التأثير التراكمى، مع افتراض أن كل آليل سائد يضيف قدرًا ثابتًا وإضافيًا إلى الصفة (عن Paulus ١٩٩٦).

عدد الجينات (ن)	الجيل الثانى	العشيرة الأحادية المضاعفة
١	١:٢.١	١:١
٢	١:٤:٦:٤ ١	١ ٢.١
٣	١٠٦٠١٥:٢٠ ١٥٠٦.١	١ ٣ ٣ ١
٤	١٠٨ ٢٨:٥٦:٧٠ ٥٦ ٢٨ ٨ ١	١.٤ ٦.٤ ١
عدد الأشكال المظهرية	$٢^{ن}$ + ١	ن + ١

جدول (٧-٨) نسبة التراكيب الوراثية الأصيلة المتنحية فى عشيرة الجيل الثانى مقابل النسبة فى حالة النباتات الأحادية المضاعفة فى حالة عدد (ن) من الجينات التى تعزل انعزالاً حرًا (عن Paulus ١٩٩٦)

عدد الجينات المستعملة فى انعزالها (ن)	الأحادية المضاعفة	عشيرة الجيل الثانى
١	١/٢	١/٤
٢	١/٤	١/١٦
٣	١/٨	١/٦٤
٤	١/١٦	١/٢٥٦
٥	١/٣٢	١/١٠٢٤
٦	١/٦٤	١/٤٠٩٦
٧	١/١٢٨	١/١٦٣٨٤
٨	١/٢٥٦	١/٦٥٥٣٦
٩	١/٥١٢	١/٢٦٢١٤٤
١٠	١/١٠٢٤	١/١٠٤٨٥٧٦
ن	١/$٢^{ن}$	١/$٢^{٢ن}$

أصناف المحاصيل الزراعية التى طُوِّرت من خلال تربية النباتات الأحادية

• تتضمن قائمة المحاصيل الزراعية التى حدث فيها تقدم كبير فى مجال تقنيات زراعة المتوك وحبوب اللقاح، والتى أنتجت منها بالفعل أصنافًا جديدة محسنة بتلك التقنيات، ما يلى:

الأسبرجس
الكرنبيات *Brassica oleracea*
الشعير
الأرز
البطاطس
الذرة
لفت الزيت *Brassica napus*
الفلفل
التبغ
الشوفان *Secale cereale*
القمح

● وتتضمن قائمة الأصناف الجديدة التى طورت من خلال مزارع المتوك، ما يلى (عن Bajaj ١٩٩٠، و Veilleux ١٩٩٤).

المحصول	الصنف	الدولة	سنة الإنتاج
الأسبرجس	Andreas	فرنسا	١٩٩٠
الذرة	Huayu 1	الصين	١٩٨٦
الأرز	Hua Yu I	الصين	١٩٧٦
	Hua Yu II	الصين	١٩٧٦
	Xin Xiu	الصين	١٩٧٦
	Late Keng 959	الصين	١٩٧٨
	Tung Hua 1,2, and 3	الصين	١٩٧٨
	Zhonghua 8 and 9	الصين	١٩٨١
	Hua Han Zao	الصين	١٩٨٢
	Huajian 7902	الصين	١٩٨٣
	Nanhua 5	الصين	١٩٨٣
	Noll	الصين	١٩٨٣
	Hua 03	الصين	١٩٨٩
	Guan 18	الصين	١٩٩٠
التبغ	Tan Yuh 1, 2, and 3	الصين	١٩٧٤
	NC 744	الولايات المتحدة	١٩٨٠
	KDH 926, 959, and 960	الولايات المتحدة	١٩٨٩
	NCBMR 42 and 90	الولايات المتحدة	١٩٩٠
القمح	Jinghua 1	الصين	١٩٨٦
	Florin	فرنسا	١٩٨٧
	Anther Culture 28	الصين	١٩٩٠

● ونقدم – فيما يلي – أمثلة على أصناف محصولية محسنة أنتجت بمضاعفة نباتات أحادية حُصل عليها بطرق مختلفة (عن Khush & Virmani ١٩٩٦):

أولاً أصناف الشعير

Rodeo
Mingo
Gwylan
Craig
Winthrop
Etienne
TBC 555-1
TBR 579-5

ثانيًا. أصناف أنتجت بتقنية مزارع المتوك:

١ – أصناف الأرز:

Huai Uii II
Huai Uii I
Tan Feng No. 1
Xin Xiu-1
Qu – Hwa No. 2
Ou – Hwa No. 1
Huayu-2
Huayu-1
Zong Hua 9
Zhong Hua 8
Huahanzhao
Huajian 7902
Nanhua 11
Nanhua 5
Yingyou No. 2
Qianhua No. 1
Huayu 15
Hwaseongbyeo
Hwajinbyeo
Zhe Keng 66
Hwacheongbyeo
Suweon
Aya
Shan Hua 369
Hwayeongbyeo
Shirayukihime
Hirohonami
Hirohikari

٢ – أصناف التبغ

F 211
Tan Yuh No. 1
Tanyu – 3
Tanyu – 2

Hai Hua - 19	Lynd
Hai Hua - 30	Hai Hua – 29
	Hai Hua – 31

٣ — أصناف القمح:

Florin	Jinghua No. 1
Lunghua – 1	Huapei – 1
GK Ambitus	Delibab
Zing Hua 1	Jingdan 2288
Zing Hua 5	Zing Hua 3

● تلعب مزارع المتوك وحبوب اللقاح — حاليًّا — دورًا كبيرًا فى إنتاج أصناف الأسبرجس المذكرة (التى تكون جميع نباتاتها مذكرة)؛ فبسبب حالة انفصال الجنس فى هذا المحصول .. يستحيل إجراء التلقيح الذاتى سوى فى النباتات الـ andromonoecious (التى تحمل أزهارًا مذكرة وأزهارًا كاملة) التى تظهر أحيانًا بنسبة منخفضة جدًّا. ويعتقد بأن حالة الجنس فى الأسبرجس قد يتحكم فيها جين واحد أو مجموعة مركبة من الجينات التى تُحمل على كروموسوم واحد، مع كون النباتات المؤنثة متماثلة homomorphic والنباتات المذكرة غير متماثلة heteromorphic فى هذا الكروموسوم. وعلى الرغم من توفر النباتات الأحادية التى تنتج بكريًّا بصورة طبيعية منذ سنوات كثيرة، فإنها كانت غالبًا نباتات مؤنثة. ولقد سمحت مزارع حبوب اللقاح بإنتاج نباتات مذكرة فائقة أصيلة يمكن أن تعطى نسلاً مذكرًا فقط عند تلقيحها مع النباتات المؤنثة. ولقد طورت فى فرنسا عديد من السلالات من خلال التكوين البكرى، ومزارع المتوك وقيمت الهجن بينها لعدة سنوات فى برنامج للتربية أفرز صنفًا جديدًا مذكرًا أطلق عليه اسم Andreas، وهو الذى استخدم فى إنتاجه سلالة مؤنثة أصيلة نتجت من مضاعفة كروموسومات سلالة أحادية نشأت بكريًّا، وسلالة مذكرة أصيلة (فائقة الذكورة) نتجت من مضاعفة كروموسومات سلالة أحادية نشأت من مزارع المتوك (عن Veilleux ١٩٩٤).

مصادر إضافية

المرجع	الموضوع
Nitsch (١٩٧٥)	مزارع حبوب اللقاح.
Sink & Padmanabham (١٩٧٧)	مزارع المتوك وحبوب اللقاح.
Sunderland (١٩٨٠)	مزارع حبوب اللقاح.
Chu (١٩٨٢)	استعمال النباتات الأحادية فى تربية النبات.
Dunwell (١٩٨٥)	مزارع الخلايا الأحادية.
Khush & Virmani (١٩٩٦)	استخدامات النباتات الأحادية فى تربية النبات.
Maluszynski وآخرون (١٩٩٦)	أهمية النباتات الأحادية فى التربية بالطفرات.
Jain وآخرون (١٩٩٦)	إنتاج النباتات الأحادية بشتى الطرق.
Dunwell (١٩٩٦)	تقنية مزارع الخلايا الجرثومية الصغيرة أو الأبواغ الدقيقة.
Estili & Ficcadenti (١٩٩٦)	تقنية إنتاج النباتات الأحادية بمعاملة حبوب اللقاح بالإشعاع قبل استخدامها فى التلقيح.
Keller & Korzum (١٩٩٦)	تقنية مزارع المبايض والبويضات والعوامل المؤثرة فيها
Bhojwani & Raste (١٩٩٦)	تقنية تلقيح مبايض الأزهار والإخصاب فى المزارع.
Sopory & Munshi (١٩٩٦)	تقنية مزارع المتوك والعوامل المؤثرة فيها
Read (٢٠٠٥)	المزارع الأحادية بصورة عامة

الفصل الثامن

التهجين فى البيئات الصناعية ومزارع الأجنة والإندوسبرم

إجراء التهجينات فى البيئات الصناعية

يوجد أربعة أنواع من التهجينات خارج النبات (in vitro)، كما يلى.

١ — إضافة حبوب اللقاح إلى البويضات المفصولة excised ovules، فيما يعرف باسم in vitro ovular pollination، وهو ما يطلق عليه التلقيح فى أنبوبة الاختبار test-tube pollination.

٢ — إضافة حبوب اللقاح إلى البويضات المتصلة بمشيمتها فى بيئة صناعية، فيما يعرف باسم in vitro placental pollination.

وتسمى المزارع فى الحالتين السابقتين باسم مزارع البويضات (مزارع البوييضات أو البذيرات) ovule culture.

٣ — إضافة حبوب اللقاح إلى مياسم الأزهار التى فصلت أمتعتها ووضعت فى بيئة صناعية، فيما يعرف باسم in vitro stigmatic pollination، كما تعرف المزارع فى هذه الحالة باسم مزارع المبايض ovary culture، وهى التى يمكن الرجوع إلى تفاصيلها فى Zenkteler (١٩٨٠)

٤ — إضافة حبوب اللقاح إلى مياسم الأزهار الكاملة التى فصلت عن النبات الأم ووضعت فى بيئة صناعية ، فيما يعرف — كذلك — باسم in vitro stigatic pollination، إلاّ أن هذه المزارع تعرف باسم مزارع الأزهار flower culture

إجراء التهجينات فى مزارع الأزهار

لم تلق مزارع الأزهار اهتمامًا كبيرًا من قبل الباحثين. ومن بين الحالات القليلة التى لاقت نجاحًا أنه أمكن تحفيز تكوين براعم على قطاعات طولية رقيقة من أعناق أزهار

١٥ صنفًا من الطماطم زرعت فى بيئة موراشيج وسكوج زودت بتركيزات مختلفة من الأوكسينات والسيتوكينينات، وكان الأيزاتين isatin (وهو: indole 2,3-dione، ويعتبر من بادئات الأوكسين الذى يتحول ببطء إلى أوكسين) .. كان أكثر مصادر الأوكسين فاعلية فى تكوين البراعم دون تكوين مسبق للجذور. كذلك كان الزياتين zeatin أكثر السيتوكينيات تأثيرًا فى تحفيز نمو وتطور البراعم. وقد تكونت – بصورة منتظمة – البراعم الزهرية التى تطورت إلى ثمار ناضجة فى الصنف Pixie Hybrid II مع المعاملة بالأيزاتين بتركيز ١٠ ميكرو مولار + الزياتين بتركيز ٣ ميكرو مولار. نمت الثمار فى بيئة الزراعة بكريًّا ووصل قطرها إلى نحو ١٥مم، ونضجت سريعًا، وكان لونها وطعمها طبيعيين. كذلك تكونت براعم زهرية على قطاعات أعناق الصنفين Yellow Canary، و LA 2705، لكن باقى الأصناف المختبرة لم تنتج براعم زهرية (Kaur-Sawheny وآخرون ١٩٩٦).

ولقد أمكن الاستفادة من مزارع الأزهار فى إجراء التهجينات البعيدة، وعلى سبيل المثال .. يتطلب التهجين بين الفجل *Raphanus sativus* ولفت الزيت *Brassica napus* زراعة الأجنة الهجين فى مرحلة مبكرة من تكوينها، ليمكن المحافظة عليها، الأمر الذى يتطلب مهارة ووقتًا طويلين. ولكن أمكن إجراء هذا التهجين بنجاح دونما حاجة إلى إجراء أى زراعة للبويضات أو للجنين بإجراء التهجين الجنسى فى أزهار مزروعة فى بيئة صناعية خاصة (Metz وآخرون ١٩٩٥).

إجراء التهجينات فى مزارع البويضات

سبقت الإشارة إلى مزارع البويضات فى الفصل السابع فى معرض تناولنا لموضوع إنتاج النباتات الأحادية، وما يهمنا فى هذا المقام هو كيفية الاستعانة بمزارع البويضات فى إنتاج التهجينات البعيدة؛ إذ إنها تفيد فى التغلب على المشاكل السابقة للإخصاب فى هذه النوعية من التهجينات.

تخصى الأمهات قبل تفتح الأزهار بيومين، وتكيس، ثم تنقل الأزهار المخصية إلى المختبر بعد موعد تفتحها الطبيعى بيوم أو يومين؛ حيث يزال الكأس والتويج، ويغمس

المتاع وعنق الزهرة – إن وجد – سريعا في ٧٠٪ كحولاً، ثم يطهران سطحيًا بأحد المطهرات المناسبة، ويغسلان جيدًا بماء مقطر معقم يُزال بعد ذلك كل من الميسم والقلم وجدار المبيض.

تستخدم المشيمة الكاملة التي تحمل البويضات في حالات التلقيح المشيمي Placental Pollination وقد تقطع المشيمة إلى أجزاء، يحمل كل منها عددًا من البويضات، كما قد تزال المشيمة كلية في حالات تلقيح البويضات Ovular Pollination أما في حالات التلقيح الميسمي Stigmatic Pollination . فإن متاع الزهرة يبقى بأكمله، ويعقم سطحه الخارجي جيدًا، على ألا يلامس المطهر سطح الميسم وربما لا يحتاج متاع الزهرة إلى التعقيم إن كان مُغَلَّفًا بصورة جيدة، كما في الذرة.

وتجمع متوك غير متفتحة من الآباء، وتحفظ في طبق بترى معقم إلى أن تتفتح؛ حيث تنقل حبوب اللقاح بحرص، وتوضع على البويضات المزروعة، أو على مشيمتها، أو على مياسم المبايض المزروعة حسب الحالة.

هذا ويكون الهدف النهائي من هذه المزارع هو الحصول على بذور مكتملة التكوين من مزارع البويضات، سواء أكانت البويضات بمشيمة، أم كانت دون مشيمة، والحصول على ثمار كاملة ناضجة تحتوى على بذور مكتملة التكوين من مزارع المبايض وقد أمكن إنتاج بذور عدد من الهجن النوعية بواسطة مزارع البويضات بنوعيها، كما أمكن الحصول على ثمار ناضجة في البيئات الصناعية من مزارع المبايض لعدد من المحاصيل الزراعية، منها الفراولة، والطماطم، والتبغ، والفاصوليا، والجركن، إلا أن الثمار كانت أصغر من نظيرتها التي تتكون طبيعيًا على النبات (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

بيئات مزارع المبايض والبويضات

تعد البيئة المناسبة للزراعة أهم العوامل التي تتحكم في نجاح مزارع البويضات والمبايض .. علمًا بأن البيئة يجب أن تناسب إنبات حبوب اللقاح، إلى أن يتم الإخصاب، ثم تطور البويضات المخصبة إلى بذور كاملة تحتوى على أجنة مكتملة التكوين. هذا .. ولا يعد إنبات حبوب اللقاح في البيئات الصناعية مشكلة؛ لأنها تنبت

بسهولة، كما يكون إنبات حبوب اللقاح طبيعيًا على الميسم وداخل القلم – بعيدًا عن بيئة الزراعة – في مزارع المبايض أما نمو البذور .. فإن له متطلبات خاصة، ويبين جدول (٨-١) تركيب واحدة من أكثر البيئات استعمالاً في مزارع البويضات الملقحة وهي بيئة نتشه المحورة.

جدول (٨-١): تركيب بيئة Nitch المحورة التي يشيع استعمالها في زراعة البويضات الملقحة culture of in vitro pollinated ovules (عن Bhojwani & Raste ١٩٩٦).

التركيب	التركيب (جزء في المليون)
$CaNO_3.4H_2O$	٥٠٠
KNO_3	١٢٥
KH_2PO_4	١٢٥
$MgSO_4$ $7H_2O$	١٢٥
$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٢٥
Na_2MoO_4	٠,٠٢٥
$ZnSO_4.7H_2O$	٠,٥
$MnSO_4.4H_2O$	٣,٠
H_3BO_3	٠,٥
$FeC_6O_5H_7.5H_2O$	١٠,٠٠
Glycine	٧,٥
Ca-Pantothenate	٠,٢٥
Pyridoxine-HCl	٠,٢٥
Thiamine HCl	٠,٢٥
Niacin	١,٢٥
Sucrose	٥٠٠٠٠
Agar	٧٠٠٠

أهمية مزارع المبايض والبويضات للمربي

يستفاد من مزارع المبايض والبويضات في جوانب التربية التالية:

١ – إنتاج النباتات الأحادية، من خلال عملية التوالد الذاتي، وقد أسلفنا تفصيل ذلك في الفصل السابع.

٢ – التغلب على حالات عدم التوافق (سواء أكان ذاتيًا، أم خلطيًا) فى مزارع البيضات نظرًا لأنه تتم إزالة أنسجة المبيض الأمية المسئولة عن حالة عدم التوافق.

٣ – التغلب على مشاكل العقم فى بعض الهجن النوعية البعيدة (بين أنوع من أجناس مختلفة من نفس العائلة intergeneric crosses)، أو من عائلات مختلفة interfamily crosses). وقد أمكن بالفعل إنتاج لاقحات zygotes تحتوى على هيئات كروموسومية لأنواع بعيدة، ونمت هذه اللاقحات إلى درجات مختلفة من التطور نحو تكوين الأجنة (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣، و Jain وآخرين ١٩٩٦، و Taji وآخرين ٢٠٠٢).

ونلقى – فيما يلى – الضوء على استخدام مزارع المبايض والبويضات فى إجراء التلقيحات الذاتية والتهجينات البعيدة.

● يوضح جدول (٨–٢) أمثلة عديدة لحالات ناجحة للتلقيح المشيمى، أو تلقيح البويضات الذاتى فى المزارع.

● يوضح جدول (٨–٣) أمثلة أخرى عديدة لحالات ناجحة لتلقيحات نوعية أو جنسية أجريت فى المزارع، ونتجت عنها أجنة حية ومكتملة التكوين.

● من أمثلة الهجن النوعية الصعبة التى أمكن إنتاجها بكل من مزارع المبايض، ومزارع البويضات الهجين *B. napus* x *B. juncea* (والهجين العكسى كذلك). وقد أظهرت نباتات الجيل الثانى تباينًا واسعًا فى الصفات (Bajaj وآخرون ١٩٨٦).

○ استخدمت تقنية مزارع البويضات والأجنة فى الحصول على هجين نوعى بين البصل والثوم؛ فبعد تلقيح أزهار البصل بلقاح الثوم، فصلت نحو ٣٠٠٠٠ بويضة من أزهار البصل بعد ٢–٣ أيام من التلقيح، وزرعت على بيئة صناعية، حيث نمت إلى أجنة، زرع منها ٥٠ جنينًا أعطت نباتات صغيرة، أكمل النمو منها ١٨ نباتًا أنتجت أبصالاً كانت مماثلة فى الشكل للبصل، ولكنها احتوت على بادئ النكهة الرئيسى الخاص بكل من البصل (S-propenyl-L-cysteine sulfoxide)، والثوم (S-allyl-L-

cysteine sulfoxide)، وهو الألـيين allıın. وقـد تأكـد أن تلـك النباتـات الثمـانى عشـر كانـت هجنًـا بكـل مـن الفحـص المظهـرى، وتحليـل أيزوزيمـات الإسـتيريز esterase، ودراسة الكروموسـومات، واختبـار الـ southern blotting مـع اسـتعمال الـ rDNA كـ "مجَسّ" probe (Ohsumi وآخرون ١٩٩٢).

جدول (٨-٢). أمثلة لبعض الحالات الناجحة للتلقيح المشيمى أو تلقيح البويضات الذاتى ف المزارع، والتى نتج عنها بعض البذور القادرة على الإنبات (عن Bhojwani & Raste ١٩٩٦).

النوع النباتى	بيئة الزراعة البيئة الأساسية[أ]	السكروز (٪)	الإضافات (مجم/لتر)
Brassica campestris	MS	٢	--
B. napus	MS	٢	—
B. oleracea	N	—	—
Zea mays	GP	٥	GA_3 (١٠)
	LS	١٥	—
	MS	٧	CH (٥٠٠) + IAA (١) + كينتين (٠,٥)
	MS	٥	GA_3 (١٠,٤)
	LS	١٥	—
	MS	٧	—
	MS	٥	CH (٥٠٠)
Glycine max	MS	٦	—
Trifolium repenses	MS	٣	CH (١٠٠)
Antırrhınum majus	N	٥	CH (٥٠٠)
Nicotıana rustica	N	٥	CH (٥٠٠)
N. tabacum	N	٥	CH (٥٠٠)
Petunıa hybrıda	N	٤	CH (٥٠٠) + IAA (٠,١)

أ – البيئات الأساسية .. MS: Murashige & Skoog، و N: Nitsch، و GP: Green & Phillips، و LS: Linsmaier & Skoog. تتوفر المراجع الخاصة بتلك البيئات فى Bhojwani & Raste (١٩٩٦).

جدول (٨-٣): أمثلة لبعض الحالات الناجحة لتلقيحات نوعية أو جنسية أجريت فى المزارع، ونتجت عنها أجنة حية ومكتملة التكوين (عن Bhojwani & Raste ١٩٩٦).

التهجين	بيئة الزراعة: الأساسية[1]	بيئة الزراعة: السكروز (٪)	الإضافات (مجم/لتر)
Brassica napus x *B. campestris*	MS	٢	—
B. campestris x *B napus*			—
B. chinensis x *B. pekinensis*			—
Zea mays x *Z. mexicana*	GP	٥	GA_3 (١٠)
Nicotiana tabacum x *N. rustica*	N	٥	—
Melandrium album x *Viscaria vulgaris*	W	٢	—
M. album x *Silene schafta*	W	٢	—

أ – بيئات الزراعة .. MS: Murashige & Skoog، و GP: Green & Phillips، و W: White.
تتوفر المراجع الخاصة بتلك البيئات فى Bhojwani & Raste (١٩٩٦).

● أمكن إجراء التهجين بين النوعين *Cucurbita pepo*، و *C. moschata* من خلال مزارع البويضات ovule culture. وبينما لم تنبت الأجنة التى بداخل البويضات الكاملة عندما زرعت على بيئة صناعية، فإن إنبات الأجنة كان جيدًا عندما قطعت تلك البويضات. وقد كان معدل إنبات الأجنة أعلى فى حرارة ٢٧ْم منه فى حرارة ٢٣ْم، وحُصِل على أفضل النتائج فى بيئة موراشيج وسكوج بنصف التركيز، مع تزويدها بالسكروز بتركيز ٣٥ جم/لتر. وقد كان *C. pepo* أفضل كأم فى التهجين عن *C. moschata*، حيث أعطى نسبة أعلى من عقد الثمار، وتطورًا أفضل للأجنة. وبلغت نسبة إنبات الأجنة (للهجن التى استخدم فيها *C. pepo* كأم) التى بعمر ١٠ أيام ٤٠٪، ولكن تلك النسبة تناقصت سريعًا بعد ذلك (Hong وآخرون ١٩٩٤).

مزارع الأجنة

تستخدم مزارع الأجنة Embryo Cultures من قِبَل مربى النباتات لأجل التغلب على المشاكل اللاحقة للإخصاب فى التلقيحات البعيدة.

وتعد عملية فصل الأجنة الصغيرة، وتحديد بيئة الزراعة المناسبة أهم عاملين

يتحكمان فى نجاح مزارع الأجنة كما يجب فصل الأجنة قبل أن تبدأ فى التدهور degeneration والاختفاء في حالات الهجن النوعية البعيدة التى يحدث فيها عدم توافق بين الجنين النامى والإندوسبرم. وتتحدد المراحل المناسبة لفصل الأجنة بعدد الأيام من التلقيح

نبذة تاريخية

تحقق أول نجاح فى زراعات الأجنة فى سنة ١٩٠٤ حينما حصل Haning على نباتات كاملة من الأجنة المكتملة التكوين لإثنين من الصيليبيات بعد زراعتها على بيئة صناعية تحتوى على سكر وبعض الأملاح المعدنية. وفى عام ١٩٢٤ أثبت Dietrich إمكان استكمال الجنين لنموه فى البيئات الصناعية دون أن يمر بمرحلة سكون. وأجريت أول زراعة لجنين خاص بتهجين نوعى بواسطة Laibach فى عام ١٩٢٥، واستخدم فيها الهجين *Linum perenne* x *L. austriacum* الذى يفقد فيه الجنين حيويته إن لم يزرع فى مرحلة مبكرة من تكوينه على بيئة صناعية وفى عام ١٩٤١ اكتشف van Overbeek وآخرون إمكان زراعة أجنة الداتورة الهجين على بيئات صناعية تحتوى على لبن (إندوسبرم) جوز الهند؛ وهو الاكتشاف الذى قاد الباحثين إلى فهم أهمية النيتروجين المختزل – فى صورة أحماض أمينية – لمزارع الأجنة (عن Bridgen ١٩٩٤)

بيئات مزارع الأجنة

الاحتياجات الغذائية للأجنة

تتوقف احتياجات الأجنة من الغذاء على مرحلة نموها، وقد أمكن تمييز مرحلتين، كما يلى:

أولاً مرحلة الاعتماد على مصدر خارجى للغذاء heterotrophic phase

يعتمد الجنين الصغير فى هذه المرحلة من نموه على الإندوسبرم والأنسجة الأمية المحيطة به، ويتطلب بيئة مغذية أكثر تعقيدًا وأعلى فى ضغطها الإسموزى عما تتطلبه الأكبر عمرًا ومع استمرار نمو وتكوين الأجنة الصغيرة فإنها تتطلب بيئات معقدة مزودة بتوافيق مختلفة من الفيتامينات، والأحماض الأمينية، وهرمونات النمو. كما تتطلب أحيانًا مستخلصات طبيعية، مثل عصير الطماطم، ولبن جوز الهند .

ثانيًا: مرحلة الاعتماد الذاتي في التغذية autotrophic phase:

يكون الجنين في هذه المرحلة — التي تمثل المرحلة الثانية من نموه — قادرًا على تمثيل مركبات لازمة لنموه من الأملاح والسكر المتوفران في بيئة الزراعة. وفي هذه المرحلة .. يمكن للأجنة أن تنبت وتنمو في بيئة عضوية بسيطة مزودة بمصدر للكربون، مثل السكروز.

ولقد كانت دراسات van Overbeek وآخرون التي نشرت في عام ١٩٤٢ — والتي أضافوا فيها الإندوسبرم السائل لجوز الهند (لبن جوز الهند) إلى بيئات زراعة الأجنة التي لم تتعد بعد مرحلة النمو التوربيدى torpedo stage — كانت تلك الدراسات علامة هامة على طريق دراسة مزارع الأجنة؛ فبتحوير البيئة لتقترب من الإندوسبرم الميحط بالجنين غير المكتمل النمو في البويضة .. تحقق نجاحًا في زراعة الأجنة لم يكن ممكنًا من قبل. وقد أُعطى العامل المحفز للنمو في لبن جوز الهند اسم "عامل الجنين" embryo factor وباستعمال لبن جوز الهند في بيئة الزراعة أمكن تجنب الإنبات المبكر للأجنة قبل اكتمال تكوينها. وقد أعقب ذلك اكتشاف العديد من المواد الأخرى التي استعملت كبدائل للبن جوز الهند لأجل تحفيز نمو الأجنة في البيئات الصناعية، مثل: اللبن منزوع الدسم، وخميرة الخبز الجافة، والـ casein hydrolysate، وجميعها تحتوى على الأحماض الأمينية التي تلزم لنجاح زراعة الأجنة وقد أمكن الاستغناء عن لبن جوز الهند تمامًا بتزويد بيئة white بكل من الفوسفات، والجلوتامين، والألانين وخمسة أحماض أمينية أخرى

يعتبر السكروز هو المصدر الرئيسي للطاقة التي تلزم لزراعة الأجنة، ولكنه يفيد — كذلك — في المحافظة على الضغط الأسموزى لبيئة الزراعة في المدى المناسب، علمًا بأن الأجنة المكتملة النمو يلزمها ٢-٣٪ سكروز في بيئات الزراعة، بينما يلزم الأجنة غير المكتملة النمو ٨-١٢٪ سكروز، وهو ما يكون مماثلاً للضغط الأسموزى في الكيس الجنيني. يفيد الضغط الأسموزى المرتفع في المراحل المبكرة لنمو الجنين في منعه من الإنبات المبكر قبل اكتمال تكوينه، ومنع الخلايا — التي تكون في مرحلة الإنقسام — من الاتجاه نحو الاستطالة.

وتعد نترات الأمونيوم ونترات البوتاسيوم هما أكثر مصادر النيتروجين غير العضوى استخدامًا فى مزارع الأجنة، كما أن الصورة الأمونيومية للنيتروجين تُعد – بوجه خاص – ضرورية للأجنة الصغيرة.

وكثيرًا ما تفيد إضافة الأحماض الأمينية إلى بيئة زراعة الأجنة فى تحفيز نموها، ومن أكثرها فاعلية أحماض: الجلوتامين، والأسباراجين. وكثيرًا ما يستخدم الـ casin hydrolysate الذى يحتوى على مخلوط من ١٨ حمضًا أمينيًا .. وفى هذه الحالة لا تلزم أية إضافات أخرى من الأحماض الأمينية.

ويعتبر الآجار هو أكثر المواد استخدامًا لجعل البيئات صلبة، ويتراوح التركيز المناسب منه – عادة – بين ٠,٥٪، و ١,٥٪. وقد تؤدى التركيزات العالية من الآجار إلى تثبيط النمو بسبب تقليله لتيسر الماء، أو بسبب رداءة نوعيته وما قد يحتويه من أملاح.

هذا .. ولا تلعب منظمات النمو سوى دورًا صغيرًا فى مزارع الأجنة، ولا يبدو أن الأوكسينات تلزم إضافتها إلى بيئة زراعة الأجنة، كما أن السيتوكينيات – منفردة – تكون قليلة أو معدومة التأثير، ولكنها تحفز نمو وتميز الأجنة إذا أضيفت معها الأوكسينات وعمومًا فإن الأوكسينات والسيتوكينينات لا تضاف إلى مزارع الأجنة إلا إذا رُغب فى حث تكوين الكالس. أما الجبريللين فإنه قد يستعمل لحث الأجنة على الإنبات المبكر، أو للتغلب على حالة السكون إن وجدت (عن Bridgen ١٩٩٤)

أمثلة لبيئات مزارع الأجنة

تعتبر بيئات موراشيج وسكوج Murashige and Skoog، وجامبورج ب٥ Gamborg B5 – مع بعض التحويرات – هما أكثر البيئات استخدامًا فى مزارع الأجنة.

هذا .. إلاّ أن بيئات زراعة الأجنة المناسبة تختلف من نوع نباتى لآخر، ويبين جدول (٨–٤) تركيب أربع بيئات، استخدمت فى زراعة أجنة الشعير، وهى تحتوى – بالإضافة إلى ما هو مبين فى الجدول – على المكونات التالية:

١ – البيئة B-II: تحتوى على ١ جم حامض ماليك مذاب فى ٥٠ مل ماء، مع تعديل الـ pH إلى ٥,٠ باستعمال أيدروكسيد الأمونيوم.

جدول (٨-٤): تركيب بعض البيئات المستخدمة فى مزارع أجنة الشعير (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

المكونات	البيئات (مجم/لتر)			
	B-II	C-17	C-21	C-45
عناصر كبرى				
KNO_3	—	٣٠٠	٣٠٠	٩٠٠
$CaCl_2.2H_2O$	٧٤٠	٢٥٠	--	٤٠٠
$MgSO_4.7H_2O$	٧٤٠	٣٢٥	٣٠٠	٣٠٠
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	—	٦٠
$NaH_2PO_4.H_2O$	—	١٠٠	—	٧٥
KCl	٧٥٠	١٥٠	٣٠٠	—
KH_2PO_4	٩١٠	١٥٠	٥٠٠	١٧٠
$Ca(NO_3)_2$	—	—	٥٠٠	٣٠٠
NH_4NO_3	—	٢٠٠	—	٥٠٠
عناصر صغرى				
KI	—	٠,١٠	—	—
H_3BO_3	٠,٥	٠,٥	١٥,٠	١,٠
$MnSO_4.4H_2O$	٣,٠	٠,٥	—	٥,٠
$ZnSO_4.7H_2O$	٠,٥	٠,٢٥	—	٥,٠
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠,٠٢٥	٠,٠١٢	—	٠,٢٥
$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٢٥	٠,٠١٢	—	٠,٠١٢
$CoCl_2.6H_2O$	٠,٠٢٥	٠,٠١٢	—	٠,٠١٢
Ferric citrate	١٠	٣	٢٠	٢٠
Fe-EDTA	—	١٧,٥	١٠	٢٨
فيتامينات				
Nicotinamide	—	—	—	١,٠
Thianine HCl	٠,٢٥	٠,٢٥	١٠	١٠
Pyridoxine HCl	٠,٢٥	٠,٢٥	—	١,٠
Inositol	٥٠	٥٠	١٥٠	١٠٠
Ca-pantothenate	٠,٢٥	٠,٢٥	—	—
Glycine	—	٠,٧٥	—	—
Ascorbic acid	—	٠,٥	—	١,٠
أحماض أمينية			—	
Glutamine	٤٠٠	—	—	٩٠٠

تابع جدول (٨-٤).

المكونات	البيئات (مجم/لتر)			
	B-II	C-17	C-21	C-45
Glutamic acid	—	١٥٠	٣٠٠	—
Alanine	٥٠	٣٠	—	١٠٠
Cysteine	٢٠	—	—	—
Arginine	١٠	٢٠	٥٠	—
Leucine	١٠	١٠	—	—
Phenylalanine	١٠	٢٠	—	—
Tyrosine	١٠	—	—	—
Aspartic acid	—	٣٠	١٠٠	١٠٠
Proline	—	٥٠	٥٠	—
Valine	—	١٠	—	—
Serine	—	٢٥	٢٥	٥٠
Threonine	—	١٠	—	١٠٠
Lysine	—	١٠	—	—
Sucrose	٣٤,٠٠٠	٦٠٠٠٠	٤٥٠٠٠	٤٥٠٠٠
Agar (Difco)	٦٠٠٠	—	—	—
pH	٥	٥,٥	٥,٥	٥,٨

٢ – البيئة C-17 تحتوى على ٥٠٠ مجم حامض ستريك مذاب فى ٥٠ مل ماء مع تعديل الـ pH إلى ٥,٣ باستعمال أيدروكسيد الأمونيوم؛ و ٣٠٠ مجم من سترات ثلاثى البوتاسيوم تضاف إلى البيئة مباشرة، مع تعديل pH البيئة إلى ٥ ٥، باستعمال أيدروكسيد البوتاسيوم المعقم بالترشيح.

٣ – البيئة C-21 تحتوى على ٥٠ مجم حامض ستريك مذابة فى ٥٠ مل ماء، مع تعديل الـ pH إلى ٥٠ ٥ باستعمال أيدروكسيد الأمونيوم، وإضافتها إلى البيئة النهائية، مع تعديل الـ pH فيها إلى ٥ ٥، باستعمال أيدروكسيد البوتاسيوم المعقم بالترشيح؛ و ٢٥٠ مجم سترات ثلاثى البوتاسيوم، تضاف إلى البيئة النهائية مع تعديل الـ pH إلى ٥ ٥

٤ – البيئة C-45 تحتوى على ٣٠٠ مجم حام ماليك مذابة فى ٥٠ مل ماء يحتوى على ٣٠٠ مجم حامض ستريك مع تعديل الـ pH إلى ٥,٠ باستعمال أيدروكسيد الأمونيوم

خطوات زراعة الأجنة

تتضمن مزارع الأجنة عزل الأجنة غير المكتملة التكوين أو الأجنة الكاملة النمو وتنميتها في ظروف معقمة على بيئة صناعية مغذية، بهدف الحصول على نبات كامل منها والفكرة الأساسية وراء هذه النوعية من المزارع هي أن الهيئة الوراثية تبقى محتفظة بكينونيتها في الجنين سواء أكان متوقفًا عن إكمال نموه، أم في طريقة إلى الانهيار والتلاشي، وأن قدرة تلك الهيئة الكروموسومية على جعل الجنين يستعيد نموه الطبيعي يمكن أن تتحقق إذا ما زود الجنين بالمواد التي تلزم لنموه

تعتمد هذه التقنية على عزل الجنين دون الإضرار به، وتكوين بيئة مغذية مناسبة، وتحفيز النمو المستمر للجنين إلى حين تكوينه للبادرة.

وتستخدم زراعة الأجنة غير المكتملة النمو لإنقاذ الأجنة التي تموت طبيعيًا إن لم يتم إنقاذها، أو أنها قد لا تستكمل تطورها الطبيعي تحتاج تلك التقنية إلى مهارة فائقة في عزل الأجنة دون الإضرار بها وتجهيز البيئات المعقدة التي تلزم لاستكمال نموها ويعتمد نجاح زراعة الأجنة – إلى حد كبير – على مرحلة التكوين التي يعزل عندها الجنين.

كذلك تستعمل مزارع الأجنة المعزولة من البذور المكتملة التكوين لأجل التخلص من المركبات التي تمنع الجنين من الإنبات، أو لتقصير دورة التربية كما في حالات السكون ولا توجد مشاكل تذكر في هذه النوعية من المزارع، حيث تكون الأجنة كبيرة نسبيًا ومن السهل عزلها، كما أن بيئات الزراعة تكون بسيطة وتحتوي فقط على الآجار، والسكر، والعناصر.

لا تتطلب تقنية زراعة الأجنة تعقيم الأجنة ذاتها بعد عزلها، ذلك لأنها تكون محاطة بأنسجة أمية خالية من الملوثات. هذا إلا أنه يتعين تعقيم المبايض الكاملة ovaries أو البويضات ovules قبل عملية عزل الجنين، التي يجب أن تجرى تحت ظروف معقمة تمامًا. ولا يحتاج الأمر إلى تعقيم الأجنة التي تعزل من البذور المكتملة التكوين إلا إذا كان الغلاف البذري متشققًا. ويحتاج فصل الأجنة الصغيرة إلى الاستعانة بالمجهر

وعلى الرغم من اختلاف طريقة عزل الجنين باختلاف النوع النباتي، فإنه يفيد غالبًا عمل قطع عند فتحة النقير ثم محاولة إخراج الجنين منه بالضغط على البويضة عند الطرف الآخر. ومن الضروري الإبقاء على الـ suspensors الخاصة بالأجنة كاملة عندما يكون عزلها في مرحلة النمو القلبي أو قبل ذلك (عن Bridgen ١٩٩٤).

يكتمل نمو الأجنة بعد زراعتها، ثم تنمو معطية نباتات صغيرة، يتم نقلها بعناية إلى أصص معقمة. وجدير بالذكر أن الأجنة الصغيرة لا تكمل تكوينها، وإنما تنمو إلى كالس في بعض الحالات، ثم تتميز فيه بعد ذلك نباتات صغيرة يحدث ذلك — على سبيل المثال — في الذرة إذا زرعت الأجنة بعد حوالى ١٨ يومًا من التلقيح

وقد تمكن Harberd (١٩٦٩) من زراعة أجنة بعض الهجن النوعية في الجنس *Brassica* بطريقة سهلة، إذ قام بحصاد مبايض الأزهار الملقحة في الوقت المناسب، وعقّمها سطحيًا، وقطعها طوليًا، ثم نقلها إلى بيئة مغذية على جهاز هزاز. أدت الحركة الدائمة للبيئة المغذية إلى خروج عدد من الأجنة من المبايض؛ حيث نمت في البيئة المغذية بدرجة مماثلة لما يحدث عند اتباع الطرق الأخرى الأكثر صعوبة.

وأمكن كذلك زراعة أجنة الهجين النوعي *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* قبل اكتمال تكوينها بزراعة البذور غير المكتملة التكوين المحتوية على هذه الأجنة في بيئة خاصة أنتجت البذور نسيج كالس، تميزت فيه نباتات كانت ثنائية أو رباعية المجموعة الكروموسومية؛ مما يدل على أنها لم تنشأ من نسيج الإندوسبرم الثلاثي. كما استدل على أن هذه النباتات كانت هجنًا نوعية من صفات النوع *L. peruvianum* الذى استخدم كمصدر لحبوب اللقاح، التى ظهرت في الهجن؛ مثل وجود صبغة الأنثوسيانين (حيث استخدمت سلالة من الطماطم خالية من الأنثوسيانين كأم في التهجين)، وشكل الأوراق، والأزهار، والثمار، بالإضافة إلى عقم النباتات الهجين (Thomas & Pratt ١٩٨٢).

العوامل المؤثرة فى نمو الأجنة المزروعة

يعتمد نمو الجنين وتطوره بعد زراعته على عديد من العوامل، منها ما يلي:

١ – التركيب الوراثى للنبات

تختلف الأنواع النباتية فى مدى سهولة نمو أجنتها فى البيئات الصناعية، كما تظهر اختلافات مماثلة – أحيانا – بين أصناف النوع الواحد

٢ - حجم الجنين

تكون الأجنة الصغيرة الحجم أكثر صعوبة فى زراعتها فى البيئات الصناعية عن الأجنة الأكبر حجمًا، وتستخدم تقنيات خاصة لزيادة فرصة نجاح الأجنة المزروعة، مثل استخدام تقنية الإندوسبرم المغذى nurse endosperm، والتى تتضمن إيلاج الجنين الهجين داخل إندوسبرم يُحصل عليه من بويضة نامية طبيعيًا وناتجة من الإخصاب الذاتى لأحد أبوى الهجين، أو لنوع ثالث. ويتم نقل الجنين والإندوسبرم معًا إلى بيئة الزراعة وباتباع هذه الطريقة – التى أدخلت عليها بعض التحسينات – أمكن زيادة فرصة نجاح زراعة الهجن الجنسية إلى ٣٠–٤٠٪، مقارنة بنسبة نجاح مقدارها ١٪ عندما لا تستخدم تقنية الإندوسبرم المغذى (عن Bridgen ١٩٩٤)

ويبين جدول (٨–٥) – كمثال – المراحل التى يصل إليها نمو الجنين قبل انهياره فى بعض الهجن النوعية بالجنس *Phaseolus*

جدول (٨–٥): المراحل التى يصل إليها نمو الجنين فى بعض الهجن النوعية فى الجنس ***Phaseolus*** (عن Mok وآخرين ١٩٨٦)

التهجين	المرحلة التى يصل إليها النمو الجنينى والبذرى
P. vulgaris x *P. coccineus*	أجنة مكتملة النمو وبذور
P. coccineus x *P. vulgaris*	أجنة متغضنة وغير مكتملة التكوين حتى أواخر مرحلة تكوين الفلقات
P. vulgaris x *P. acutifolius*	أجنة غير مكتملة التكوين حتى أوائل إلى أواخر مرحلة تكوين الفلقات
وكذلك التهجين العكسى	
P. vulgaris x *P. lunatus*	أجنة فى المرحلة السابقة لمرحلة النمو القلبى
P. lunatus x *P. vulgaris*	أجنة من أربع خلايا فقط

يتبين من جدول (٨–٥) أن نمو الجنين وتطوره يعد المشكلة الرئيسية فى التهجينات النوعية فى الجنس *Phaseolus* . لذا فإن من الضرورى نقل تلك الأجنة إلى مزارع

الأجنة لكى تكمل نموها. وباستثناء التهجين *P. lunatus* x *P. vulgaris* الذى يستحيل فيه فصل الخلايا الأربع المتكونة، فإن الأجنة فى جميع التهجينات الأخرى المبينة فى الجدول تصل إلى أحجام كبيرة تناسب عملية فصلها وزراعتها دونما مشاكل.

٣ — الضوء ودرجة الحرارة:

تنمو الأجنة أحيانًا بصورة أفضل عندما يُحتفظ بها فى الظلام لمدة أسبوع واحد إلى أسبوعين — بعد زراعتها — وذلك قبل نقلها إلى الضوء للسماح بتكوين الكلوروفيل بها.

وتنمو الأجنة المعزولة — عادة — فى مجال حرارى أوسع مما يمكن أن تتحمله البذور المكتملة التكوين، وغالبًا ما تتم زراعتها فى حرارة ٢٥–٣٠°م، ولكن توجد اختلافات بين الأنواع النباتية فى هذا الشأن (عن Bridgen ١٩٩٤).

وسائل حماية الأجنة من الانهيار

كثيرًا ما تنهار الأجنة — فى مزارع الأجنة — إما لكونها تعزل وهى صغيرة للغاية، وإما لكونها تنتج تلقيحات جنسية بعيدة.

وغالبًا .. فإن الأجنة الصغيرة التى تجهض فى المراحل المبكرة لتكوينها يكون من الصعب عزلها وإلى جانب خصوصية الاحتياجات الغذائية لهذه الأجنة الصغيرة، فإن احتمالات الإضرار بها أثناء عزلها تكون كبيرة. وربما يكون من الممكن فى حالات كهذه إنقاذ الجنين من التدهور باستخدام مزارع المبايض (ovary culture) أو البوييضات (البويضات) (ovule culture).

يتم فى مزارع المبايض فصل المبايض بعد التلقيح، ويُزال من حولها الكأس والتويج والأسدية، ثم تعقم المبايض سطحيًا، وتزرع بغرسها عند الجزء المقطوع من عنق الزهرة فى البيئة المغذية، حيث ينمو المبيض ليعطى ثمرة تحتوى على بذور مكتملة التكوين.

أما فى مزارع البوييضات، فإن المبيض المعقم يشق بمشرط، ثم تخرج منه البوييضات المخصبة وتنقل إلى سطح بيئة الزراعة.

ويعزى نجاح مزارع المبايض أو البويضات عن مزارع الأجنة إلى عوامل فسيولوجية – خاصة ما يتعلق منها بالتغذية – بالإضافة إلى الحماية التى يوفرها النسيج الأمى للجنين النامى فى مزارع المبايض والبويضات (عن Bridgen ١٩٩٤).

وقد اتبعت – كذلك – فى المحافظة على الأجنة الجنسية البعيدة من الانهيار طريقة محورة تعرف باسم تقنية in vivo/in vitro transplantation، أمكن عن طريقها إجراء تهجينات بين جنس الشعير *Hordeum* وبعض الأنواع الأخرى، مثل

Hordeum x *Triticum*

Hordeum x *Secale*

Hordeum x *Agropyron*

وبمقتضى هذه التقنية، نُمِّيت الأجنة الهجين على إندوسبرم الشعير فى خارج النبات (in vitro) وحصل على الإندوسبرم من حبوب شعير بعمر ١٤–١٨ يومًا بعد استبعاد أجنتها زرعت تلك الإندوسبرمات فى بيئة صناعية، وزرعت عليها الأجنة الهجين فى مكان الأجنة الأصلية، مع استعمال أجنة هجين بعمر ٩–١٢ يومًا من التلقيح وإذا ما استعملت أجنة هجين صغيرة جدًّا، فإنه يمكن زراعة نحو ١٠ أجنة منها على كل إندوسبرم ناضج. وتفيد زراعة أكثر من جنين بالإندوسبرم الواحد فى زيادة فرصة نجاح الزراعة واكتمال نمو الأجنة الهجين. هذا وتستخدم فى تلك التقنية بيئات بسيطة لزراعة الإندوسبرم (عن Sharma وآخرين ١٩٩٦).

أهمية مزارع الأجنة

يستفاد من مزارع الأجنة فى الأمور التالية:

١ – تقصير دورة التربية بالتخلص من حالات سكون البذور التى قد تمتد إلى عدة شهور، وربما إلى سنتين أو ثلاث سنوات كما فى جنس السوسن *Iris*.

٢ – إكثار بعض النباتات التى لا تنبت بذورها، برغم احتوائها على جنين جنسى، كما فى النوع *Musa bulbisiana* القريب من الموز، وهو الذى يمكن إنتاج بادراته بسهولة بزراعة أجنة بذوره فى بيئات صناعية.

ومن المعروف أن بذور نوعا القلقاس *Colocasia esculentum*، و *C. antiquorum* لا يمكنها الإنبات فى الطبيعة، إلا أن أجنتها المفصولة أمكن زراعتها بنجاح فى بيئة مغذية

وفى السحلبية (الأوركيد) orchid تجف البذور وأجنتها مازالت فى مرحلة النمو الكروى، حيث لا يمكنها الإنبات بسبب عدم اكتمال نمو أجنتها فضلاً عن خلوها من الإندوسبرم. ولكن أمكن استنبات أجنة الأوركيد بزراعتها فى بيئة بسيطة

٣ — إنتاج النباتات الأحادية بسبب الاستبعاد الكروموسومى الذى يحدث أحيانًا بعد التهجينات البعيدة كما فى الهجين *Hordeun vulgare* x *H. bulbosum*، حيث تفقد كروموسومات *H. bulbosum* خلال الإنقسامات القليلة الأولى للاقحة، وبمضاعفة النباتات التى تنمو من الأجنة الأحادية بالكولشيسين . يتجمع لدى المربى عدد كبير من النباتات الأصيلة المختلفة عن بعضها وراثيًا، ويمكن انتخاب أفضلها؛ لتصبح أصنافا جديدة.

٤ — تفيد مزارع الأجنة فى المحافظة على أجنة الأصناف المبكرة جدًّا من بعض محاصيل الفاكهة من التدهور نظرًا لأنها تكون غير مكتملة التكوين وضعيفة الإنبات للغاية، كما فى الأصناف المبكرة من الفاكهة ذات النواة الحجرية والعنب، والكريز، حيث أمكن بزراعة تلك الأجنة فى بيئات صناعية استمرارها فى النمو وإعطائها لنباتات طبيعية وقد استخدمت تلك التقنية فى عديد من الأنواع المحصولية، منها الأفوكادو، والخوخ، والبرقوق، والنكتارين، والعنب، والبلارجونيم *Pelargonium* ولعل أبرز استخدامات تلك التقنية كانت فى تهجين سلالات العنب عديمة البذور، فلكى يكون التهجين بين أصناف العنب ناجحًا لابد أن يكون أحد أبوى التهجين بذريًا، ولكن أمكن للأجنة إكمال نموها بفصلها من الأصناف البكرية — قبل توقف نموها — وزراعتها فى بيئات صناعية (عن Sharma وآخرين ١٩٩٦).

٥ — إمكانية الحصول على الهجن البعيدة التى يستحيل إنتاجها بالطرق العادية. ويتحقق ذلك فى الحالات التى يبدأ فيها الجنين الهجين فى التكوين بصورة طبيعية بعد التلقيح والإخصاب، إلا أنه يتدهور بعد فترة. ويختفى نظرًا لعدم التوافق بين

الجنين النامى والإندوسبرم. ولقد أمكن الاستفادة من تلك التقنية فى عديد من الأجناس، مثـــل: *Prunus*، و *Carica*، و *Allium*، و *Phaseolus*، و *Brassica*، و *Cucumis*، و *Ulmus*، و *Quercus*، و *Lilium*، و *Viburnum*، و *Nicotiana*، و *Impatiens* وغيرها، كما أمكن — عن طريقها كذلك — الحصول على هجن جنسية مثـل *Hordeum* x *Secale*، و *Hordeum* x *Agropyron*، و *Triticum* x *Aegilops*، و *Triticum* x *Secale* (عن McCown ٢٠٠٣).

ولقد أمكن باستخدام تقنية زراعة الأجنة الحصول على أجنة نوعية وجنسية فى كـل من الأجناس التالية (عن Sharma وآخرين ١٩٩٦):

Lycopersicon	*Solanum*
Phaseolus	*Oryza*
Medicago	*Brassica*
Agropyron	*Hordeum*
Arachis	*Triticum*
Glycine	*Gossypium*
Trifolium	*Allium*
Helianthus	*Populus*
Vitis	*Lotus*
Citrus	*Carica*
Actinidia	*Fragaria*
Trifolium	*Vigna*

ومن بين التهجينات البعيدة فى محاصيل الخضـر التـى أمكـن تحقيقهـا بالاسـتعانة بتقنيات زراعة الأجنة، ما يلى (عن Kalloo ١٩٨٨):

Lycopersicon esculentum x *L. chilense*

L. esculentum x *Solanum lycopersicoides*

L. esculentum x *L. peruvianum*

Abelmoschus esculentus x *A. ficulneus*

A. esculentus x *A. manihot*

A. esculentus x *A. moschatus*

Glycine max x *G. tomentella*

Phaseolus vulgaris x *P. acutifolius*

Brassica oleracea x *B. campestris*

B. campestris x *B. oleracea*

B. chinensis x *B. pekinensis*

B. pekinensis x *B. oleracea*

Cucurbita pepo x *C. moschata*

P. acutifolius x *P. vulgaris*

P. coccineus x *acutifolius*

P. coccineus x *P. vulgaris*

P. vulgaris x *P. ritensis*

P. vulgaris x *P. lunatus*

ويبين جدول (٨-٦) نتائج بعض محاولات زراعة الأجنة فى جنس الطماطم *Lycopersicon*

ومن بين أهم الهجن الجنسية التى أمكن الحصول عليها بالاستعانة بتقنية زراعة الأجنة فى محاصيل الحبوب، ما يلى (عن Sharma وآخرين ١٩٩٦)

القمح × الشعير	القمح × الجاودار (الراى) rye
الشعير × الراى	الشوفان (oat) × الذرة
القمح × الذرة	*Lolium* x Festuca
Hordeum x *Elymus*	*Elymus* x *Triticum*

وقد أمكن الاستفادة من مزارع الأجنة فى إنتاج هجن نوعية صعبة فى عدد من الأجناس لنقل صفات هامة من الأنواع البرية إلى الأنواع المزروعة كما يلى:

● فى الجنس *Cucumis* تتوفر المقاومة لنيماتودا تعقد الجذور فى عدة أنواع مثل: *C. metuliferus*، و *C. anguria*، ولكنها لا توجد فى أى من القاوون *C. melo* أو الخيار *C. sativus*. وأمكن الحصول على أجنة من التهجين *C. metuliferus* x *C. melo* إلا أنه لم يمكن زراعتها لإنتاج نباتات تصلح للشتل. وأعطت التهجينات *C. anguria* x *C.*

melo، و *C. metuliferus* x *C. anguria* ثمارًا كانت خالية مـن البـذور الحيـة، إلاّ أنـه أمكن عزل أجنة حية من هذه الثمار قبل اكتمال تكوينها.

● تمكن Fassuliotis & Nelson (١٩٨٨) من الحصـول علـى النباتـات الهجـين مـن هذه الأجنة، بزراعتها بعد ٣٤–٩٩ يومًا من التلقيح.

● فى الجنس *Brassica* .. أمكن إجراء التهجين النـوعى: *B. napus* x *B. juncea*، باستخدام مزارع الأجنة (Bajaj ١٩٨٦). أما الهجين النوعى *B. napus* x *B. oleracea*، والذى تنتج بذوره بنسبة نجـاح تتراوح بـين ٠,٠٥٪، و ٠٣٪ مـن التلقيحـات .. فقـد أمكن إنتاجه، بمعدلات وصلت إلى ٢,٦٤٪ باسـتخدام مـزارع الأجنـة (Ayotte وآخـرون ١٩٨٧).

هذا .. ولمزيد من التفاصيل عن مزارع الأجنة واستعمالها فى مجال تربيـة النبـات .. يراجع Raghavan (١٩٩٣)، و Reed (٢٠٠٥).

مزارع الإندوسبرم وأهميتها

يعد الإندوسبرم نسـيجًا ثلاثيًا (٣ن)، يتكون من تـزاوج إحـدى النـواتين التناسـليتين الأحاديتين فى حبة اللقاح مع النواتين القطبيتين الأحاديتين فى الكيس الجنينى لتكوين نواة الإندوسبرم الابتدائية؛ لذا .. فإن مزارع الإندوسبرم Endosperm Culture تفيـد فـى إنتاج نباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية، ويتم ذلك إما بتكوين براعم من الإندوسبرم مباشرة، وإما بعد تكوين نسيج كالس؛ أما تكوين الأجنة .. فلـم يتأكـد بعـد فـى مـزارع الإندوسبرم.

ويتعين عزل الإندوسبرم الذى يُراد زراعته بعد مدة معينة مـن التلقيح، تختلـف مـن نوع إلى آخر؛ فهى – مثلاً – ٨–١١ يومًا فـى الـذرة، و ٤–٧ أيـام فـى الأرز؛ بينمـا لا يصلح الإندوسبرم المكتمل النمو للزراعة. وقـد نجـح إنتـاج النباتـات الثلاثيـة مـن مـزارع الإندوسبرم فى عدد محدود نسبيًا مـن النباتـات، منهـا – علـى سـبيل المثـال – الأرز، والكمثرى، والبقدونس، وبعض أنواع الجنس *Citrus*.

جدول (٨-٦) بعض محاولات زراعة الأجنة فى التلقيحات النوعية فى الجنس *Lycopersicon* (عن **Sink & Reynolds** ١٩٨٦)

التهجين	الهدف	بيئة الزراعة[1]	المدة من التلقيح إلى عزل الجنين وزراعته (يوم)
L. esculentum cv. Michigan State Forcing x *L. peruvianum*	التغلب على فشل الجنين فى إكمال نموه	HS معدلة و WM	٣٥-٤٠
L. esculentum x *Solanum lycopersicoides*	التغلب على فشل الجنين فى إكمال نموه	HS	٣٠
L. esculentum cv. Potentate x *L. peruvianum*	التغلب على فشل الجنين فى إكمال نموه	—	٣٠
L. esculentum cv. Pritchard x *L. chilense*	التغلب على فشل الجنين فى إكمال نموه	—	٣٠
L. esculentum cvs. Break O'Day, Sioux, or Cobourg x *L. peruvianum*	التغلب على فشل الجنين فى إكمال نموه	WM معدلة	٣٥-٤٠
L. esculentum x *S. pennellii* LA716	التحليل الوراثى	HA	٣٥
L. esculentum cv. San Marzano Baldoni x *L. peruvianum* LA 1283-4	التغلب على فشل الجنين فى إكمال نموه	HS	٤٠
L. esculentum cv. VFNT Cherry x *L. peruvianum* LA 1283-4	التغلب على فشل الجنين فى إكمال نموه	MS معدلة	٤٠

أ- HA: بيئة Hoagland & Arnon، و HS: بيئة Hoagland & Snyder، و MS: بيئة Murashige & Skoog، و WM: بيئة P. R. White.

إن الهدف الرئيسى من إنتاج مزارع الإندوسبرم - بالنسبة لمربى النبات - هو الحصول على النباتات الثلاثية التى تكون لها أهمية خاصة فى عديد من المحاصيل الإقتصادية الهامة؛ مثل التفاح، والموز، وبنجر السكر، والشاى، وأصناف البطيخ اللابذرى، وتعد مزارع الإندوسبرم بديلاً سهلاً للطريقة الأخرى المتبعة فى إنتاج النباتات الثلاثية وهى تلقيح نباتات رباعية مع أخرى ثنائية المجموعة الكروموسومية. وتبرز

أهمية مزارع الإندوسبرم فى الحالات التى لا يكون فيها هذا التهجين ناجحًا دائمًا كما فى الحمضيات (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Johri وآخرون (١٩٨٠).



الفصل التاسع

المُعَلِّمات الوراثية والتربية الجزيئية

إن أبسط تعريف للمُعَلِّمات الوراثية أنها جينات تتحكم في صفات يسهل التعرف عليها، وتستخدم في الاستدلال على جينات أخرى يرغب المربى في التعرف عليها.

طرز المُعَلِّمات الوراثية

تعرف عدة طرز من المُعَلِّمات الوراثية، كما يلي:

المعَلِّمات المورفولوجية

إن الصفات المورفولوجية هي أقدم المعلمات الوراثية وأكثرها استعمالاً. وأهم ما يميزها بساطتها وسهولة استخدامها.

إن الطفرات الرئيسية تعطي تأثيرًا واضحًا يسهل تمييزه على الشكل الظاهرى للفرد، وبذا .. فهي تخدم كمعلمات لأجزاء الكروموسومات التي توجد فيها تلك الجينات. وتعتمد الخرائط الارتباطية العادية على تلك المعلمات التي تُحَدَّد مواقعها على امتداد طول الكروموسومات نسبة إلى بعضها البعض، وتقاس المسافات بينها بالسنتى مورجان cM. وعندما تُظهر أى صفة ارتباطًا بمثل تلك المعلمات المورفولوجية فإن الجينات التي تتحكم فيها يفترض أن تقع قريبة من مواقع المعلمات. وتعد محدودية أعداد تلك المعلمات هي وجه القصور الرئيسي الذى يقف حائلاً أمام الاعتماد عليها في تحديد مواقع مختلف الجينات، وخاصة تلك التي تتحكم في الصفات الكمية. هذا .. فضلاً عن وجود تأثيرات متعددة لبعض الجينات المعلمة تؤثر على نسبة الانعزالات، ومن ثم تؤثر في تحديد مواقع الجينات.

المعلّمات البروتينية

تستعمل البروتينات – التى هى نواتج الجينات – كمعلمات، فيما يعرف بالمعلمات البروتينية protein markers، علمًا بأن الآليلات المختلفة للجين الواحد تُنتج بروتينات مختلفة ذات محتوى متباين من الأحماض الأمينية. ويدخل ضمن المعلمات البروتينية الأيزوزيمات isozymes باعتبارها بروتينات، وهى من أكثر المعلمات الوراثية التى استخدمت خلال الربع الأخير من القرن العشرين

يُشير المصطلح أيزوزيمات إلى الإنزيمات ذات النشاط الواحد. لكنها تختلف فى وزنها الجزيئى وبالقدرة على الحركة فى حقل كهربائى، حيث تستخدم أجهزة الـ gel electrophoresis فى فصل الأيزوإنزيمات، بينما تستخدم الـ polyacrylamide gels فى فصل بروتينات البذور ويحدث الاختلاف فى الحركة نتيجة للطفرات العاملية التى يترتب عليها بعض التغيرات فى الأحماض الأمينية لنفس الإنزيم، أى تكون الأيزوزيمات منتجات لآليلات مختلفة للجين الواحد، وليس لجينات مختلفة ويعرف النظام التى تترتب فيه الإنزيمات المتحصل عليها من تركيب وراثى معين – بالفصل الكهربائى electrophoresis – باسم gene banding، وهو نظام خاص ومميز للمحتوى الآليلى. لهذا التركيب الوراثى. وتعد شرائط ترسيب الإنزيمات enzyme bands ممثلة للآليلات، وتنتج الـ banding patterns لمختلف التراكيب الوراثية من تعدد الاليلات polymorphism هذا إلاّ أن تلك الجينات – وهى مندلية بسيطة وذوات سيادة مشتركة – لا تتوزع اعتباطيًا فى كل الهيئة الكروموسومية.

هذا وتسمح طبيعة السيادة المشتركة codominance للمعلمات الأيزوزيمية بتمييز التركيب الوراثى الخليط عن الأصيل السائد والأصيل المتنحى وقد ترتبط تلك المعلمات الأيزوزيمية بأى صفة، الأمر الذى يمكن التعرف عليه بتحليل النسل المنعزل فى كل من المعلمات والصفة التى يُراد دراستها ومن أمثلة هذه الارتباطات تلك التى وجدت بين المقاومة لنيماتودا تعقد الجذور والجين Aps-1 المتحكم فى إنتاج الإنزيم acid phosphatase فى الطماطم (عن Bretting & Widrlechner ١٩٩٥، و Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

معلمات الدنا، أو المعلمات الجزيئية

يقدر أن كل كروموسوم يحتوى على نحو $١٠^{٨}$–$١٠^{١٠}$ زوجًا من القواعد الآزوتية. إلاّ أن نحو ١٠٪ منها فقط هى التى تكون نشطة فى عملية الـ coding، بما يعنى أن الجزء الأكبر من المادة الوراثية لا يلاحظ له تأثير واضح على الشكل المظهرى للفرد ويمكن تحديد نقاط محدودة من الدنا – سواء أكانت نشطة فى الـ coding، أم غير نشطة – كمعلمات.

ويعرف معلم الدنا DNA marker بأنه جزء صغير من الدنا تظهر به تتابعات متنوعة sequence polymorphism فى أفراد مختلفة من النوع الواحد. تكثر تلك التباينات فى التتابعات بدرجة كبيرة فى مختلف الكائنات الحية، تزيد كثيرًا عن درجة التغيرات فى شحنات البروتينات (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

إن مبدأ المعلمات الوراثية الجزيئية يعتمد على استعمال جزء الدنا أو المُعَلِّم كنقطة مرجعية للمقطع الكروموسومى الذى يقع فيه ذلك الجين المعلم وما يجاوره، بما يسمح بإمكان متابعة ذلك المقطع من خلال المعالجات الوراثية المناسبة. وتتطلب تلك الطريقة توفر آليلات أخرى للجين المعلم على المقاطع الكروموسومية الأخرى المثيلة (المناظرة) له، والتى يمكن تكرارها فى أفراد أو سلالات أخرى ويمكن – حينئذ – تقييم علاقات تلك المقاطع الكروموسومية المعلمة بالتعبير عن صفات كمية معينة، بينما تسمح للمناطق الكروموسومية الأخرى فى نفس الأفراد وللعوامل البيئية المؤثرة فى تلك الصفات لأن تتباين فى تأثيراتها عشوائيًا (عن Stuber ١٩٩٢).

ولقد أحدثت تقنية المُعَلِّمات الجزيئية molecular markers technology ثورة شاملة فى مجال تربية النبات. وقد طورت عدة أنواع من تلك التقنيات لتسهيل تحليل الجينومات (الهيئات الوراثية) النباتية.

يصف مصطلح تعدد الطرز (أو البوليمورفزم) polymorphism حالة تواجد طرزًا مختلفة من ذات المعلم الوراثى فى العشيرة الواحدة

وتعد الـ DNA polymorphisms أكثر التباينات الوراثية من حيث درجة توريثها،

وهى يمكن أن تستعمل فى النباتات لثلاث هيئات وراثية (genomes)، وهى الخاصة بالنواة، والبلاستيدات الخضراء، والميتوكوندريات

وتتميز المعلمات الجزيئية molecular markers على المعلمات المظهرية morphological markers، بما يلى (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢):

المعلمات المورفولوجية	المعلمات الجزيْئية
١ — لا يمكن التمييز بين الأشكال المظهرية لمعظم المعلمات المورفولوجية إلا على مستوى النبات الكامل.	يمكن التمييز بين التراكيب الوراثية على مستوى النبات، والأنسجة، وحتى على المستوى الخلوى.
٢ — لا يتوفر الكثير من الآليلات المتميزة للمعلمات المورفولوجية	يتوفر عدد كبير نسبيًّا من الآليلات — التى توجد طبيعيًّا — من المعلمات الجزيئية.
٣ — ترتبط المعلمات المورفولوجية — عادة — بتأثيرات مظهرية غير مرغوب فيها.	لا ترتبط المعلمات الجزيئية — عادة — بأى تأثيرات غير مرغوب فيها.
٤ — تكون الآليلات عادة سائدة أو متنحية؛ مما يجعل من الصعوبة انتخاب التراكيب الوراثية المتنحية	تُظهر الآليلات — عادة — سيادة مشتركة؛ مما يجعل بالإمكان التمييز بين كل التراكيب الوراثية الممكنة المنعزلة.
٥ — تحد تأثيرات التفوق القوية من عدد المعلمات التى يمكن الاستفادة منها فى العشيرة الانعزالية الواحدة	تسمح حالات التفوق والتأثير المتعدد القليلة نسبيًّا بعدد غير محدود من المعلمات التى يمكن الاستفادة منها فى العشيرة الانعزالية الواحدة
٦ — ترتبط بمرحلة محددة من النمو.	لا ترتبط بمرحلة محددة من النمو.

الشروط التى يجب توفرها فى المُعَلِّمات الوراثية

إن أهم المتطلبات التى يجب توفرها فى المُعَلِّمات الوراثية، ما يلى:

١ – يجب أن تكون متعددة الصور polymorphic، ويفضل أن تكون متعددة الصور بدرجة عالية highly polymorphic وإذا لم يتحقق هذا الشرط فى المعلمات الوراثية فإنها لا يمكن أن تقوم – بكفاءة – بعديد من الوظائف المنوطة بها هذا مع العلم بأن المعلمات الوراثية المتعددة الصور بدرجة عالية توجد بها عديدًا من الآليلات فى كل موقع.

٢ – يجب أن تكون المعلمات الوراثية ذوات درجات توريث عالية؛ بمعنى ألاّ يتأثر

شكلها المظهرى كثيرًا بالتباينات فى العوامل البيئية، أو بالتفاعلات بين التركيب الوراثى والبيئة. وما أن يتم التعرف على كيفية توريث تلك المعلمات، فإنها يمكن أن تستعمل دونما حاجة إلى مكررات، كما يمكن تحديد درجة تماثلها مع المعلمات الأخرى التى من نفس الطراز (مثلاً .. المورفولوجى، والإيزوزيمات ... إلخ)، وإنه لمن الضرورى ألا تُقارن سوى المعلمات المتماثلة homologus، وهى التى ينشأ التشابه المظهرى فيها من التقارب الوراثى.

٣ – يجب أن تكون المعلمات الوراثية بسيطة فى وراثتها، ويفضل أن يتحكم فيها جينات مندلية تكون آليلاتها ذات سيادة مشتركة.

٤ – أن يتحكم فى الأشكال المظهرية المختلفة للمعلم الوراثى المثالى من طراز معين جينات مختلفة تتوزع على الهيئة الكروموسومية بأكملها.

٥ – توجد أمور عملية أخرى يجب توفرها فى المعلم الوراثى المثالى، مثل عدم تأثيره على بقاء النبات من عدمه (مثل طفرات الألبينو)، أو فى حيويته، وأن يتم التعرف عليه بسهولة ومبكرًا فى حياة النبات، وألا يكون الاختبار مكلفًا أو ضارًا بالصحة العامة (عن Bretting & Widrlechner ١٩٩٥).

تتوفر تلك الشروط فى عديد من المعلمات الوراثية، مثل الـ RFLPs (وهو أحد أنواع المعلمات الجزيئية)، مما يجعلها تتميز على المعلمات الموفولوجية فى كثير من الأمور، وهى التى نعيد التأكيد عليها فيما يلى:

١ – يمكن عند استعمال المعلمات الجزيئية تحديد التركيب الوراثى على مستوى النبات، أو النسيج، أو حتى أحيانًا على المستوى الخلوى، بينما لا يمكن تحديد التركيب الوراثى عند استعمال المعلمات المورفولوجية إلاّ على مستوى النبات الكامل فقط، وغالبًا ما يتطلب الأمر نباتًا مكتمل النمو.

٢ – تتوفر – غالبًا – فى معظم الأنواع النباتية – آليلات كثيرة متعددة لمعظم المعلمات الجزيئية، وبذا يمكن استعمال التباينات الطبيعية المتواجدة فى العشائر المتوفرة دونما حاجة إلى تطوير سلالات وراثية، مثلما يتطلب الأمر بالنسبة لكثير من المعلمات الوراثية.

٣ – بينما تكون غالبية العلمات الأيزوزيمية ومعلمات الـ RFLP ذات تـأثير محايـد على الشكل المظهرى فإن العلمات المورفولوجية تُحدث – غالبًا – تـأثيرات كـبيرة علـى الشكل المظهرى، كثيرًا ما تكون ضارة فى عشائر التربية.

٤ – كثيرًا ما تمنع تفـاعلات السـيادة والتنحـى تمييـز كـل التراكيـب الوراثيـة ذات الصلة بالصفات المورفولوجية، بينمـا تسـلك جميـع المعلمـات الجزيئيـة سـلوك السـيادة المشتركة

٥ - تحدث تفاعلات كثيرة غير مرغـوب فيهـا بـين المواقـع الجينيـة المتحكمـة فـى العلمات الموفولوجية، يمكن أن تحد من عدد العلمات المنعزلة التـى يمكـن تقييمهـا فـى العشيرة المنعزلة الواحدة. هذا بينما نجد أن معظـم المعلمـات الجزيئيـة تبـدو خاليـة مـن تأثيرات التفوق، بما يعنـى إمكـان متابعـة أى عـدد مـن العوامـل الوراثيـة فـى العشـيرة الواحدة (عن Stuber ١٩٩٢).

تقنيات تداول الدنا وإكثاره وأنواع المُعَلِّمات الجزيئية

نتناول بالذكر والشرح الموجز تحت هذا العنوان التقنيات التالية:

نقنية الـ Polymerase Chain Reaction

تعرف هذه التقنية – اختصارًا – باسـم PCR، وهى تستخدم فى الإكثار غير المحـدود لأى جزئ يتم عزله من الدنا (جين كامل أو جزءًا من جين)، باسـتعمال أجهـزة خاصـة صممت لهذا الغرض، يتم عن طريقها محاكاة عملية الاسـتنساخ الطبيعية للجينات.

ومن أهم مزايا وعيوب هذه التقنية، ما يلى:

المزايا

يتحقق بالـ PCR المزايا التالية:

١ – يمكن بواسـطتها إنتاج كميـات كـبيرة مـن جزيئـات الـدنا المتماثلـة مـن كميـة متناهية الصغر، هى التى تستخدم كبداية. وفى الواقع فإن الدنا المعزول من خلية مفـردة (حتى ولو كان من بروتوبلاست نباتى) يكفى لاستمرار واستكمال العملية

٢ – تعد التقنية سريعة وبسيطة.

٣ – تعد التقنية شديدة الحساسية

٤ – لا يلزم أن يكون الدنا نقيًا لأجل إكثاره وتضخيمه، شريطة ألاّ تحتوى العينة على شوائب يمكنها تثبيط الـ Taq polymerase

العيوب

إن من أهم عيوب الـ PCR، ما يلى

١ – يجب أن تعرف تتابعات النيكليوتيدات – على الأقل – فى الأجزاء الحدودية لجزيئ الدنا، بما يسمح للـ oligonucleotide primers بالالتحام وتمثيل الدنا وهذا الشرط يقصر استعمال تقنية الـ PCR على الجينات التى تمت دراستها وتوصيفها – ولو جزئيًا – بطرق الـ cloning

٢ – تعد الـ PCR تقنية شديدة الحساسية، وقد تعطى إشارات خاطئة، وهى التى تنتج – غالبًا – من ملوثات من الدنا تتواجد فى الجهاز من استعمال سابق له (عن Chawla ٢٠٠٠).

الأيزوزيمات (الأيزوإنزيمات والأللوزيمات)

يُعنى بالمصطلح أيزوزيم isozyme (أو أيزوإنزيم isoenzyme) – فى معناه الواسع – أى بروتينين يمكن تمييزهما عن بعضهما البعض، حيث يكون لكل منهما نشاط حركى مختلف وإن كانا يقومان بتحفيز نفس التفاعل الكيميائى الحيوى. وتعد الأيزوإنزيمات مجموعة من الجينات المتقاربة multigene family، قد تظهر بها اختلافات ثانوية فى تتابع قواعدها الآزوتية

تستخدم عديد من التقنيات الكيميائية الحيوية فى تمييز الأيزوإنزيمات المختلفة، إلاّ أن أكثر الطرق استعمالاً من قبل باحثى الوراثة وتربية النبات هى طريقة الفصل الكهربائى الأفقى التى تعرف باسم horizontal starch gel electrophoresis، والتى تفصل البروتينات – أساسًا – على أساس الشحنة والحجم

وقد أظهرت الدراسات الكيميائية الحيوية والوراثية على طبيعة الأيزوزيمات عدة طرز مختلفة من التباينات، حيث أمكن تمييز ما لايقل عن سبعة أقسام مختلفة من

الأيزووزيمات، يهمنا منها قسم أو فئة الأيزوزيمات التى تنتج بفعل التعدد الآليلى allelic polymorphism على المستوى الجينى، والتى تعرف باسم ألوزيمات allozymes، والتي يكون من المكن – غالبًا – الربط بين أى منها وصفات معينة، مما يجعلها مفيدة كثيرًا فى مجال التربية.

ومن بين الوسائل الأخرى التى يمكن استعمالها فى تحليل الألوزيمات، ما يلى:

١ – تقنية الـ polyacrylamide gel electrophoresis (أو PAGE).

٢ – تقنية الـ isolectric focusing (أو IEF) على جل من الـ agrose أو الـ polyacrylamide (عن Weeden ١٩٨٩).

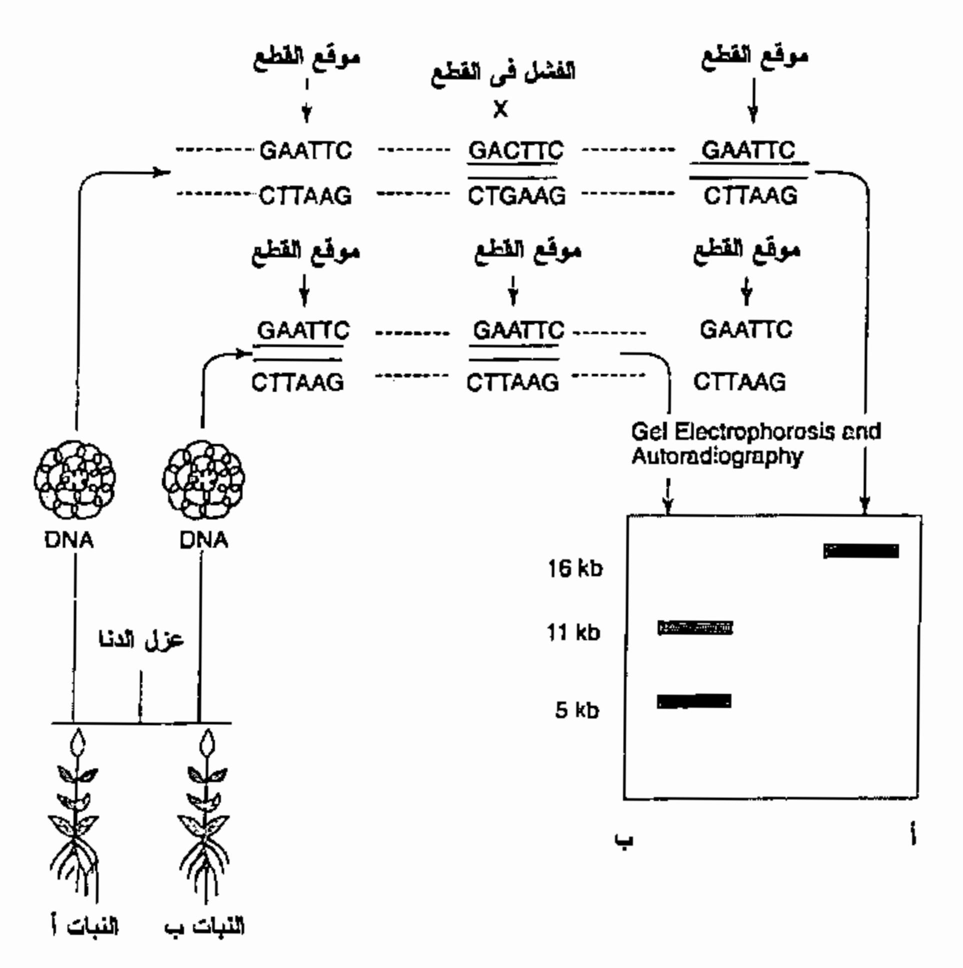
تقنية الـ Restriction Fragment Length Polymorphism

تعرف هذه التقنية – اختصارًا – باسم RFLP، وهى تعد أكثر التقنيات استعمالاً فى عمل الخرائط الكروموسومية الجزيئية لمختلف الأنواع النباتية. وتعتمد تلك التقنية على الاستفادة من الاختلافات فى تتابع النيكليوتيدات التى تقوم عندها الإنزيمات القاطعة restriction enzymes بقطع شريط الدنا. وتتضمن التقنية استخلاص الدنا، ثم هضمه بمجموعة مختارة من الإنزيمات القاطعة، وفصل القطع الناتجة بالـ electrophoresis، وسبر (أوجس) الـ blot بأجزاء معلومة من الدنا (فيما يعرف باسم Southern blots).

تورث الـ RFLPs بنظام السيادة المشتركة، كما تكثر بها الآليلات. ويمكن الوثوق فى تماثل القطع ذات التحرك الكهربائى المتماثل إذا ما وضع المجس فى موقع جينى معين ويؤخذ على هذه التقنية احتياجها إلى كميات كبيرة من الدنا لإجراء التحليل، وتكلفتها العالية. واحتياجها لوقت طويل، مما جعلها أقل صلاحية للاستخدام على نطاق واسع فى برامج التربية (عن Bretting & Widrlechner ١٩٩٥، و Taji وآخرين ٢٠٠٢).

يتم تحليل التباين عند مستوى الدنا بتقطيع الدنا الكامل للفرد باستعمال إنزيمات القطع restriction enzymes، وهى إنزيمات تتوفر فى البكتيريا التى تستفيد منها كوسيلة للدفاع بها ضد الفيروسات يتعرف كل restriction enzyme على موقع محدد من الدنا – يتكون – عادة – من ٤–٨ أزواج من القواعد، ينشط عندها فى قطع خيطا

الدنا. توجد تلك المواقع فى أماكن عديدة من جينوم الفرد الواحد، الأمر الذى يترتب عليه تقطيع أوصال الدنا - بإنزيم واحد - إلى عدد كبير من القطع، ويتوقف طول كل قطعة على المسافة بين مواقع التقطيع. ويمكن باستعمال الـ electrophoresis للدنا المصبوغ التعرف على قطع الدنا ذات الأطوال المختلفة (شكل ٩-١)، إلاّ أن عدد القطع يكون كبيرًا جدًا؛ الأمر الذى يجعل من الصعب ملاحظة كل قطعة على انفراد. ولهذا يتم خفض عدد القطع بالغربلة باستعمال مجسات تتهجن مع بعض القطع فقط؛ وهى التى تكملها وتتطابق معها، ويمكن التعرف عليها بالـ autoradiography.



شكل (٩-١): تمييز أجزاء من الدنا باستعمال تقنية الـ AFLP (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

وقد استخدم مصطلح RFLP لوصف هذا التباين الخاص بكل تركيب وراثى – والذى يظهر بالـ autoradiography – والذى يتحدد بأطوال قطع الدنا.

ويتحدد مدى الـ polymorphism، بالـ restriction enzyme المستعمل وترتيب القواعد فى المجس؛ ولذا .. تستخدم عدة مجسات و restriction enzymes.

ويتم تقييم كل الأفراد فى عشيرة منعزلة مثل الجيل الثانى لكل توليفة من الإنزيم والمجس. يقارن الـ banding pattern بين الأفراد، ويعامل التباين – المتحصل عليه بإنزيم معين فى كل قطعة دنا – كـ RFLP واحد.

ويمكن الحصول على المجسات إما من الـ cDNA library، وإما من الـ genomic library (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

كانت الـ RFLP أولى التقنيات استخدامًا وانتشارًا فى تحليل الاختلافات فى الدنا النباتى، وتتوفر حاليًا خرائط RFLP لعديد من الأنواع النباتية، كما يتوفر عديد من مجسات الـ RFLP (أى RFLP probes) من دراسات الخرائط؛ بما يسمح باختيار مجموعة من المجسات لمسح وفحص الهيئة الوراثية بحثًا عن أى تغيرات فيها. توفر معلمات الـ RFLP (أى RFLP markers) وسيلة فعّالة لتحليل الهيئة الكروموسومية النباتية لتعرف أى تباينات وراثية جديدة، حتى ولو كان التغير فى قاعدة آزوتية واحدة. ويعيب هذه التقنية عدم توفر المجسات المناسبة لعدد كبير من الأنواع النباتية القليلة الأهمية (عن Henry ١٩٩٨).

تقنية الـ Random Ampilified Polymorphic DNA

تعرف هذه التقنية – اختصارًا – باسم RAPD، وهى – كذلك – تسمح بمسح الهيئة الكروموسومية بحثًا عن أى تغيرات وراثية. تقود هذه الطريقة عند استعمالها إلى توليد معلمات جزيئية يمكن تحليلها بسهولة بطريقة الفصل الكهربائى على جل الأجاروز، ومع استعمال صبغة الـ ethidium bromide. تتميز هذه الطريقة ببساطتها وعدم حاجتها المسبقة إلى مجسات مناسبة، ولذا .. فهى تعد من أكثر الطرق شيوعًا فى تحليل تباينات المزارع.

بينما يمكن باستعمال تقنية الـ RFLP التعرف على الآليلات المختلفة للجين بدقة كبيرة، فإن تقنية الـ RAPD تُفيد فى التعرف على عدد أكبر من المواقع الجينية وتستعمل كمعلمات لكل الهيئة الكروموسومية. وهى أسهل استعمالاً، ولا يلزم لتطبيقها أكثر من ١٠–١٥ نانوجرامًا من الدنا (مقارنة بالحاجة إلى نحو ٢–١٠ ميكروجرامًا من الدنا فى حالة تطبيق تقنية الـ RFLP)، كما أنها لا تتطلب استعمال النظائر المشعة ويعتقد بأن تقنية الـ RAPD مناسبه - خاصة - لرسم خرائط جينات الصفات الكمية، كما يمكن استعمالها فى التعرف على الهجن الجسمية، وفى تخطيط استراتيجيات تقييم وحفظ الأصول الوراثية (Waugh & Powell ١٩٩٢)

تعتمد تقنية الـ RAPD على تقنية الـ PCR، حيث يستعمل primer مفرد قصير من النيكليوتيدات (a single short oligonucleotide primer) يمكنه الالتحام مع مواقع كثيرة يستعمل فى تضخيم وإكثار تتابعات عشوائية من قالب template معقد من الدنا مثل جينوم النبات وفى معظم النباتات يتوقع من الـ primers التى تتراوح أطوالها بين ٩، و ١٠ نيكليوتيدات أن يتولد منها ٢–١٠ نواتج إكثار وتضخيم amplification products تكون الـ primers غالبًا ذوات تتابعات عشوائية، وإن كانت منحازه لتحتوى على ٥٠٪ على الأقل من الـ GC، وتفتقد إلى التكررات الداخلية يمكن فصل نواتج الإكثار والتضخيم بسهولة بتقنيات الفصل الكهربائى العادية وتميز بالأشعة فوق البنفسجية ينتج الـ polymorphism عن التغيرات التى تحدث إما فى تتابع مواقع الالتحام بالـ primer (طفرات عاملية)، وإما عن التغيرات التى تحور الحجم أو تمنع تضخيم الدنا المعنى (حالات الفقد والإضافة والانقلاب). هذا وتورث نواتج التضخيم كمعلمات سائدة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

تقنيات أخرى

من بين التقنيات الأخرى – التى تعتمد على تقنية الـ PCR – وتستخدم فى التعرف على المواقع الجينية المتعددة الطرز (الـ polymorphic)، ما يلى:

الاسم المختصر	التقنية
DAF	DNA Amplification Fingerprinting
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
SSRs	Short Sequence Repeats
SSRs	Simple Sequence Repeats أو
STRs	Short Tandem Repeats أو
TGGE	Temperate Gradient Gel Electroporesis
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region Markers
AP-PCR	Arbitrarily-Primed PCR
AS-PCR	Allele Specific PCR
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism
µsat	Microsatellite

أهمية المُعَلّمات الوراثية لمربى النبات

لكل طراز من المعلمات الوراثية أهميته الخاصة فى مجال تربية النبات، كما أن لها استعمالات عامة، كما يأتى بيانه.

أهمية المعَلّمات الأيزوإنزيمية

إن للمعلمات الأيزوإنزيمية (الأللوزيمات) استعمالات كثيرة فى مجال تربية النبات، كما يلى:

١ – وصف وتمييز مجاميع الأصول الوراثية والأصناف التجارية·

تستعمل المعلمات الأيزوزيمية – فى مجال مجاميع الأصول الوراثية – فيما يلى:

أ – وصف العشيرة أو الصنف.

ب – تحديد الاختلافات الوراثية بين الأفراد أو الأصناف.

جـ – تحديد العلاقة والقرابة الوراثية phylogenetic relationships داخل النوع

د – تحليل مسارات الهجرة للنوع من مراكز النشؤ.

هـ – تحديد السلالات المتكررة.

و – المساعدة فى تخطيط رحلات استكشاف الجيرمبلازم الجديدة.

هذا .. ويمكن تقسيم المحاصيل الزراعية الهامة حسب مدى التباينات فى الألوزيمات التى أمكن التعرف عليها فى كل من مجاميع الجيرمبلازم وبين الأصناف إلى الفئات التالية:

أ – محاصيل ذات تباينات ألوزيمية كبيرة فى كل من مجاميع الجيرمبلازم وبين الأصناف، وتتضمن البصل، والكرنبيات، والتفاح، والعنب، والذرة.

ب – محاصيل ذات تباينات ألوزيمية كبيرة فى مجاميع الجيرمبلازم، ولكن بدرجة أقل بين الأصناف، وتتضمن: الكوسة، والفراولة، والشعير، والعدس، والبسلة، والقمح.

جـ – محاصيل ذات تباينات ألوزيمية كبيرة فى مجاميع الجيرمبلازم، ولكن بدرجة قليلة جدًّا بين الأصناف، وتتضمن: الفلفل، والطماطم.

د – محاصيل ذات تباينات ألوزيمية قليلة نسبيًّا فى كل من مجاميع الجيرمبلازم وبين الأصناف، وتتضمن: الفول السودانى، والشوفان، والبنجر، والباباظ، والقرطم، والكتناء، والحمضيات، والجوز، والزيتون، والأرز، والزبدية، والفاصوليا، ونخيل البلح، والكمثرى، والفجل، وقصب السكر، والراى، والسورجم، والبطاطس، والفاصوليا.

هـ – محاصيل ذات تباينات ألوزيمية قليلة نسبيًّا فى مجاميع الجيرمبلازم، وقليلة جدًّا بين الأصناف، وتتضمن: الخيار، والقاوون، والكريز، والبرقوق.

ولقد استعمل تحليل الألوزيمات فى تعريف وتمييز عدد كبير من أصناف الكثير من المحاصيل الزراعية. ويتطلب الأمر للاستفادة من تلك التقنية لهذا الغرض توفر تباينات ألوزيمية كبيرة بين الأصناف، وهو الأمر الذى لم يتحقق فى محاصيل مثل الطماطم، والفلفل، والخيار.

٢ – التأكد من كون الأصناف الهجين هجينة بالفعل.

٣ – تعليم بعض الجينات التى تتحكم فى صفات بسيطة هامة (جدول ٩–١).

٤ – تحليل حالات التضاعف الثلاثى triploidy والتضاعف غير التام aneuploidy

٥ – تحليل تباينات مزارع الأنسجة somaclonal variation

٦ – تحليل أنساب الأصناف والسلالات، خاصة فى محاصيل الفاكهة

٧ - تحديد درجة الخلط الوراثى heterozygosity المسئولة عن قوة الهجين heterosis

٨ – تحديد مستوى التضاعف.

٩ – تحليل الصفات الكمية والتعرف على الجينات المسئولة عنها.

١٠ – وضع الخرائط الكروموسومية.

١١ – توفير فرصة أفضل لنجاح التهجينات البعيدة فى تحقيق أهدافها باختيار نباتات الجيل الثانى والأجيال التالية التى تحتوى – بالإضافة إلى الصفة التى يُراد نقلها من النوع البرى – على أكبر قدر من أيزوزيمات النوع المزروع (عن Weeden ١٩٨٩).

جدول (٩–١) المعلمات الأيزوزيمية المستخدمة فى تحديد جينات تتحكم فى صفات هامة (عن Weeden ١٩٨٩)

المحصول	جين الأيزوزيم	الصفة المعلمة (والجين المسئول عنها)
الطماطم	Aps-1	القاومة لنيماتودا تعقد الجذور (Mi)
	Prx-2	العقم الذكرى (Ms)
	Prx-1	عدم التوافق الذاتى (S)
البسلة	Pgm-p	المقاومة لفيرس موزايك الفاصوليا الأصفر (Mo)
	Idh	التخصص الفسيولوجى لسلالات الرايزوبيم (Sym-2)
	Adh-2	المقاومة لفيرس Pea enation mosaic (En)
	Est-S	المقاومة للسلالة رقم ١ من الفيوزاريم (Fw)
التبغ	Prx-1	عدم التوافق
	Prx-7	عدم التوافق
الذرة	Acp-1	المحصول (صفة كمية)
	Acp-4	المحصول (صفة كمية)
الطماطم	Pgi-1	تحمل البرودة (صفة كمية)
الكوسة	Aldo-2	المقاومة لفيرس موزايك البطيخ رقم ٢ (صفة كمية)

أهمية تحليل الـ RFLP

يستخدم تحليل الـ RFLP فى مجال تربية النبات لتحقيق الأهداف التالية:

١ - تبيان العلاقات بين مختلف سلالات الأصول الوراثية.

٢ - تعليم الجينات المفردة التى تتحكم فى الصفات الهامة.

٣ - تحليل الصفات الكمية ذات الأهمية الاقتصادية إلى جيناتها المفردة التى تتحكم فيها ومعرفة مواقعها الكروموسومية.

لقد أدى الربط بين الصفات الكمية وخريطة الـ RFLP إلى حدوث تقدم كبير فى التربية لتحسين تلك الصفات، وكانت الطماطم هى المحصول "الموديل" الذى أجريت عليه أولى الدراسات فى هذا المجال، والتى تضمنت المقاومة للحشرات، ومحتوى الثمار من المواد الصلبة الذائبة، وكفاءة استعمال مياه الرى (عن Briggs ١٩٩٢، و Helentjaris ١٩٩٢).

أهداف التربية الجزيئية

إن من بين أهداف التربية الجزيئية molecular breeding (التى تعتمد فى إجرائها على المعلمات الجزيئية)، ما يلى:

١ - توفير مُعَلِّمات جزيئية للصفات المرغوب فيها، مثل المقاومة للأمراض، وتحمل الشد البيئى، والمحصول العالى، وامتصاص العناصر والاستفادة منها بكفاءة ... إلخ لأجل برامج تحسين المحاصيل.

٢ - تطوير أدوات للتعرف على سلالات مسببات الأمراض التى توجد بالنبات والتربة وتقدير كثافة تواجدها.

٣ - تطوير المحاصيل الزراعية من خلال إجراء تحويرات فى مسارات أيضية معينة سواء أكانت خاصة بالنمو والتطور، أم بتمثيل مركبات كيميائية معينة.

٤ - تطوير معلمات جزيئية للتعرف على نوعية المنتج، مثل لون الدقيق (الطحين)، وتركيب النشا والبروتين فى الحبوب.

٥ – المساعدة في تحسين الاختبارات الحيوية الخاصة بالسلوك المحصولي وزيادة سرعتها (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

التعرف على الجينات المرغوب فيها ورسم الخرائط الكروموسومية الجزيئية

يستفيد مربي النبات من المُعلِّمات الجزيئية molecular markers في التعرف على الجينات التي تتحكم في صفات معينة، وهي الجينات التي لا تعطي تأثيرًا واضحًا ومميزًا بسهولة على الشكل الظهري؛ فتلك الصفات تصعب ملاحظتها، ولا يكون فيها الشكل المظهري الواضح للعيان ممثِّلاً تمثيلاً صادقًا للتركيب الوراثي للفرد.

ومن أمثلة تلك الصفات التي يفيد فيها استعمال المعلمات الجزيئية، ما يلي:

١ – صفات المقاومة للأمراض والحشرات التي لا تظهر إلاَّ إذا تعرض الفرد للإصابة بالمسبب المرضي المعني، أو بالحشرة المعنية.

٢ – صفة العقم الذكري التي لا يمكن التعرف عليها قبل مرحلة الإزهار

٣ – صفات جودة الحبوب والثمار التي تبقى غير معروفة حتى نضج الحبوب أو الثمار.

٤ – الصفات الكمية، مثل المحصول، والتبكير، والتأقلم . والتي لا يمكن أبدًا إرجاعها إلى جينات محددة من مجرد دراسة الشكل المظهري للفرد.

وفي جميع تلك الصفات وأمثالها يسعى المربي إلى انتخاب النباتات المرغوب فيها على أساس خاصية يسهل ملاحظتها أو بالاستعانة بالمعلمات التي ترتبط بالجينات التي تتحكم في تلك الصفات وعلى الرغم من أن المربي يربط في بعض الحالات بين الصفات المورفولوجية والجينات التي تتحكم في صفات معقدة، إلا أن العدد المتوفر من تلك المعلمات المورفولوجية morphological markers محدود للغاية؛ بحيث لا يمكن الاعتماد عليها كدليل لكل جزء من دنا الفرد، وخاصة فيما يتعلق بالصفات الكمية، إلاَّ أن الأمر يختلف بالنسبة للمعلمات الجزيئية.

إن رسم الخريطة الكروموسومية بالاعتماد على المعلمات الجزيئية - فيما يعرف بالخريطة الجزيئية - أصبح أمرًا ميسورًا بالنسبة لعديد من الأنواع النباتية؛ نظرًا لتوفر أعداد كبيرة جدًا من المعلمات الجزيئية، مثل معلمات الدنا، التى تستخدم فى دراسات ارتباط كل منها بالصفات الاقتصادية الهامة. ونظرًا لأن تحديد تلك الخرائط والتعرف على الوضع النسبى لكل جين ومدى ارتباطه بالمعلمات الجزيئية يتطلب إجراء حسابات كثيرة للغاية؛ لذا .. فإنه يُعتمد لأجل تحقيق ذلك على برامج كمبيوتر خاصة، مثل برنامج MAPMAKER.

ويعد تحديد مواضع الجينات الاقتصادية الهامة بالنسبة إلى معلم وراثى معروف أمرًا ضروريًا لعزل هذا الجين، وتحليله، وإكثاره، ونقله إلى أى تركيب وراثى مرغوب فيه.

رسم الخرائط الكروموسومية: المبدأ والطريقة

تقع الجينات على الكروموسومات فى صف طولى وفى أماكن ثابتة منها، بحيث يمكن تحديد مواقعها بالنسبة لبعضها البعض. وتعرف عملية تحديد تلك المواقع باسم رسم الخرائط الجينية، وهو أمر مهم فى عملية عزل الجينات وتداولها فى تقنيات الهندسة الوارثية. هذا .. وتشكل كل الجينات التى تقع على كروموسوم ما مجموعة ارتباطية، بحيث يقود التعرف على أى جين منها إلى تحديد الكروموسوم المعنى.

ويعتمد تعيين جين جديد إلى مجموعة ارتباطية على علاقته - عند النقل - بأى من الجينات فى تلك المجموعة الارتباطية. ويدل انعدام الانعزال المستقل لجينين أو أكثر على وجودهما معًا على كروموسوم واحد، إلا أن العكس لا يكون دائمًا صحيحًا؛ لأن الجينات التى تقع على كروموسومات مختلفة، وتلك التى تقع متباعدة على نفس الكروموسوم (> ٥٠ سنتى مورجان cM) يمكن أن تُظهر انعزالاً حرًّا. وفى حالات كهذه يتعين استعمال جينات إضافية معلمة، أو سلالات خاصة (cytogenetic stocks) - مثل السلالات ذات التعدد الكروموسومى غير التام aneuploids - فى عملية التحليل الوراثى.

يُشكل الموضع الحقيقى للجينات على امتداد الدنا (والتى تتحدد بالـ kbp) ما يعرف باسم الخريطة الفيزيائية physical map، بينما تُشير الخريطة الوراثية genetic map إلى الموقع النسبى للجينات الذى يتحدد من معدل الانعزالات الآليلية لجينين تنعزل الجينات الواقعة على كروموسوم ما عن طريق تكوين كيازما chiasmata يعنى تكوين كيازما واحدة بين جينين تكوين ٥٠٪ تراكيب انعزالية جديدة، ويُعطى طول الجزء الكروموسومى بينهما – فى المتوسط – القيمة ٥٠ سنتى مورجان وعمليًا فإن عدد التراكيب الانعزالية - وليس تكوين الكيازمات بين جينين – هو الذى يقرر المسافة الوراثية بينهما فمثلاً .. يعنى تكوين تراكيب انعزالية بنسبة ٢٠٪ وجود كيازمات بين الجنين بمعدل ٤٠، (ناتج ٢٠/٥٠)، والتى يحسب منها طول الجزء الكروموسومى بين الجينين هكذا

المسافة بين الجينين = ٠٫٤ × ٥٠ = ٢٠ سنتى مورجان

يعنى ذلك أن معدل الانعزالات يمكن اتخاذه دليلاً مباشرًا على المسافة الوراثية بين الجينات التى تقع على كروموسوم ما، لكن ذلك الاستنتاج لا يكون دائمًا صحيحا، لأن معدل الانعزالات ذاتها ليس سوى انعكاس للكيازمات (أى لتبادل الأجزاء الكروموسومية) ومن الأمور المسلم بها أن ظهور كيازما فى جزء من الكروموسوم يعيق تكوين كيازما أخرى فى جزء آخر منه، فيما يعرف بظاهرة الإعاقة interference وفى واقع الأمر أن الإعاقة تكون كاملة فى المسافات الكروموسومية التى لا تزيد عن ١٥ سنتى مورجان، وذلك فى معظم الكائنات الحية؛ فمثلا لو كان لدينا ثلاثة جينات A، و B، و C – بهذا الترتيب على الكروموسوم الحامل لهم – فإن العبور بين A، و B يقلل من نسبة العبور الممكنة بين B، و C وبذا .. فإن معدل العبور فى الأجزاء المختلفة من الكروموسوم لا يمكن إضافتها إلى بعضها البعض لتشكل المسافة الإجمالية بالسنتى مورجان، بمعنى أن العلاقة البسيطة بين نسبة التراكيب العبورية والمسافة الكروموسومية بالسنتى مورجان (حيث يفترض أن ١٪ تراكيب عبورية تعنى ١ سنتى مورجان) لا يمكن تطبيقها بتلك البساطة وعمليًا .. تُحَوَّل نسبة التراكيب العبورية إلى

مسافة بالسنتى مورجان من خلال ما يعرف باسم mapping function، حسب المعادلة التالية:

$$p = ½ (1-e^{-μ})$$

أو $$μ = \log_e(1-2p)$$

حيث إن:

p = نسبة التراكيب العبورية.

μ = نسبة الكيازمات أو العبور.

e = الأساس للوغاريتم الطبيعى.

ونظرًا لأن الكيازما الواحدة تعنى ٥٠٪ تراكيب عبورية، ومن ثم ٥٠ سنتى مورجان، فإن ٥٠ μ لقيمة معينة من p تعطى المسافة الوراثية بين الجينات. ويتطلب رسم خريطة كاملة لأى مجموعة عبورية تحليل الانعزالات لعدد كبير من الجينات. كما يتطلب رسم الخرائط الكروموسومية للمعلمات الجزيئية - التى تتواجد بوفرة - حسابات كثيرة جدًّا تجرى عادة باستعمال برامج حاسوب خاصة مثل الـ MAPMARKER، والـ JOIN MAP وغيرهما (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

رسم خرائط الجينات المتحكمة فى الصفات الكمية

إن رسم الخرائط الكروموسومية الكاملة للـ polygenes التى تتحكم فى الصفات الكمية أصبح أمرًا ممكنًا باستخدام المعلمات الجزيئية عن طريق ما يعرف بالـ Quantitative Trait Loci Mapping (اختصارًا: QTL mapping)؛ وبذا .. يمكن تداول تلك الجينات - ذات التأثير المحدود لكل منها على الصفة الكمية - كالجينات الرئيسية التى تتحكم فى الصفات البسيطة، بعدما كان أقصى ما يمكن معرفته - من خلال دراسات الوراثة الكمية - أخذ فكرة عامة عن عددها وطريقها فعلها الجينى؛ علمًا بأن الجينات التى تتحكم فى الصفة الواحدة تتوزع غالبًا على عدة كروموسومات، وربما تتوزع على كل الهيئة الكروموسومية للكائن الحىّ.

كذلك يمكن عن طريق الـ QTL mapping تحديد العدد الدقيق للجينات التى تتحكم

فى أى صفة كمية، وأيها ذات تأثير متعدد، وأيها أقوى تأثيرا على الصفة، وهل هى تتوزع عشوائيًا فى الهيئة الكروموسومية أم تتجمع فيما يعرف بالبقع (الكروموسومية) الساخنة hot spots، وكيف تُحدث كل منها تأثيرها .. بطريق مباشر، أم من خلال بعض المركبات، هذا بالإضافة إلى إمكانية الحصول على معلومات عن أسباب قوة الهجين،ودور كلا من السيادة الفائقة والتفوق فيها، وكذلك إمكان دراسة التفاعل الوراثى البيئى بطريقة أكثر دقة.

ومن خلال الـ marker-assisted selection يمكن إسراع الانتخاب فى برامج التربية لتحسين الصفات الكمية وجعله أكثر فاعلية (Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

إن المعلمات الجزيئية ليست سوى أجزاء صغيرة محددة من الدنا، ولا تمثل أى جينات، ومن ثم فليس لها أى تأثير متعدد على الصفات المدروسة، وهى تتوفر بكثرة شديدة فى أجزاء الهيئة الكروموسومية. وغالبيتها ذات سيادة مشتركة ولا تتأثر مطلقًا بالعوامل البيئية، بحيث أن التركيب الوراثى لأى معلم يمكن تحديده دونما أى خطأ وبسبب تلك الخصائص مجتمعة فإن المعلمات الجزيئية استعملت وتستعمل كثيرًا فى تحديد مواقع الجينات التى تتحكم فى الصفات الكمية.

ويتطلب رسم خرائط جينات الصفات الكمية QTL mapping، ما يلى:

١ – توفر خريطة كثيفة (مشبعة saturated) للمعلمات الجزيئية لتعريف وتحديد كل جزء صغير من الهيئة الكروموسومية

٢ – تكوين عشيرة مناسبة لرسم الخريطة الكروموسومية تكثر فيها الانعزالات للصفات الكمية، وذلك بتلقيح سلالات متباينة بشدة مورفولوجيا فى الصفة الكمية المعينة ومن السمات الضرورية فى تلك العشيرة أن يتوفر فيها حالة من عدم التوازن الارتباطى القوى عند المواقع المعلمة والآليلات المتحكمة فى الصفات والمرتبطة بالمعلمات

ويمكن أن تستخدم لرسم خرائط الصفات الكمية عشائر الجيل الثانى، أو التلقيحات الرجعية، أو نباتات أحادية مضاعفة، أو سلالات انعزالية مرباة داخليًّا.

إن من أكثر العشائر الوراثية استخدامًا فى رسم خرائط الجينات المتحكمة فى

الصفات الكمية الأجيال الانعزالية، وخاصة الجيل الثانى الناتج من التلقيح الذاتى لجيل أول حُصل عليه بتلقيح آباء أصيلة وراثيًا. كذلك استعمل جيل التلقيح الرجعى بين الجيل الأول وأحد الآباء لهذا الغرض. ويمكن اختيار سلالات الآباء على أساس تباينها الشديد فى الصفات الكمية موضع الدراسة، إلا أنه فى بعض المحاصيل - كالذرة - يتوفر - عادة - فى الجيل الثانى تباينا وراثيًا واسعا على الرغم من احتمال تشابه سلالتى الآباء مورفولوجيًا. وبمتابعة انتقال كل مقطع كروموسومى بمعلمات معروفة، فإنه يمكن حصر كل الهيئة الكروموسومية - مقطعًا بمقطع - للمواقع الجينية المتحكمة فى الصفة الكمية والمزاملة للتباين فى أى صفة كمية مرغوب فيها كذلك فإن مدى إسهام كل مقطع كروموسومى فى التأثير على الصفة يمكن التعبير عنه كميًا بالطرق الإحصائية وباستعمال عدد كاف من المعلمات الوراثية الموزعة بتجانس على الهيئة الكروموسومية، مع وصف تأثير كل منها منفردًا وتفاعلاتها معا (عن Stuber ١٩٩٢).

هذا وتتميز عشائر الجيل الثانى بأن بها أقوى حالات عدم التوازن الارتباطى، كما أنها تتطلب عددًا أقل من النباتات لإجراء التحليل عما تتطلبه عشائر التلقيحات الرجعية. وعلى الرغم من أن عشائر الجيل الثانى والتلقيحات الرجعية تتميز بكونها أقوى فى حالات عدم التوازن الارتباطى عن السلالات النقية الانعزالية، فإن الأخيرة تتميز - نظرًا لكونها أصيلة وراثيًا - بإمكان إجراء عددًا أكبر من المكررات؛ بما يسمح بالحد من تأثير التفاعل بين التركيب الوراثى والبيئة على متوسطات قيم الصفات. ونظرًا لأن تلك السلالات تمثل عدة دورات من الانعزالات (التى تحدث أثناء التربية الداخلية للسلالات) .. فإنها تفيد فى التعرف على أجزاء صغيرة جدًا من الكروموسومات تكون قريبة جدًا من المعلمات الجزيئية. ويعنى ذلك أن الخرائط المستمدة من تلك السلالات تكون أكثر دقة عما فى الخرائط المستمدة من عشائر الجيل الثانى والتلقيحات الرجعية، هذا بينما نجد أن الخرائط المستمدة من السلالات الأحادية المضاعفة (وهى التى تكون ناتج انقسام اختزالى واحد) تكون أقلها وضوحًا.

ويستخدم فى تحليل خرائط الصفات الكمية إحدى طريقتين، هما:

● Single-marker analysis

● Interval mapping

وللإطلاع على التفاصيل الخاصة بهاتين الطريقتين، وبإجراء تحاليل رسم الخرائط الكروموسومية للصفات الكمية . يراجع Chahal & Gosal (٢٠٠٢).

وكما أسلفنا بيانه فإن عملية تربية النبات لتحسين الصفات الكمية تعتمد – حاليًا – على أساس الارتباط الوراثي المحسوب إحصائيًا بين معلمات الـ RFLP ومواقع الجينات التي تتحكم في الصفات الكمية، ولقد طورت المبادئ التي تحدد تلك الارتباطات في ثلاثة بحوث نشرت على الطماطم خلال الفترة من ١٩٨٧ إلى ١٩٩٣، إلاّ أنه في مقال تناول تلك البحوث بالتشريح والنقد قدم Arunachalam & Chandrashekaran (١٩٩٣) ما يفيد بأن المفاهيم التي بنيت عليها التحاليل الإحصائية فيها لم تكن كافية أو ملائمة.

التطبيقات العملية في مجال رسم الخرائط الكروموسومية الجزيئية

من بين أوائل الدراسات التي أجريت على رسم الخرائط الكروموسومية للصفات الكمية، دراسة أجريت على صفات حجم ثمرة الطماطم، ومحتواها من المواد الصلبة الذائبة ورقم الحموضة (الـ pH) بها أظهرت نتائج تلك الدراسة أنه باستخدام تقنيات رسم الخرائط الكروموسومية للصفات الكمية يمكن تحديد الجينات التي تتحكم فيها مثلما يكون عليه الحال في الصفات المندلية. تم في تلك الدراسة تحليل ٢٣٧ نباتًا من نسل تهجين رجعي بين الطماطم المزروعة *Lycopersicon esculentum* والنوع القريب *L. chmielewskii* باستعمال ٧٠ موقع من الـ RFLP، وأمكن تحديد ٦ مواقع تتحكم في حجم الثمرة، و ٥ مواقع للـ pH، و ٤ مواقع للمواد الصلبة.

وفي دراسات تالية أجرى التحليل على ٣٥٠ نباتًا من عشيرة جيل ثان لتلقيح أجرى بين الطماطم كأم، و *L. cheesmanii* كأب بالإضافة إلى بعض عائلات الجيل الثالث، وذلك في ثلاثة أماكن. وفي تلك الدراسة أمكن التعرف على ٢٩ موقعًا جينيًا تتحكم في كل من حجم الثمرة والـ pH ومحتوى المواد الصلبة الذائبة، منها ٤ مواقع جينية فقط أمكن تحديدها في كل مواقع الدراسة. ويستفاد من ذلك أن دراسات تحديد مواقع الصفات الكمية التي تجرى في موقع واحد لا تُظهر كل الجينات التي تتحكم في تلك

الصفات. ولقد أظهرت تلك الدراسة وجود جينات رئيسية وأخرى ثانوية التأثير، كما أظهرت نوع الفعل الجينى (سائد – متنحى – إضافى) لكل موقع جينى. وكذلك تبين أن نسبة التباينات التى تحكمت فيها المواقع الجينية المكتشفة فى تلك الدراسة بلغت ٦٧٪ من التباينات الكلية فى صفة حجم الثمرة، و ٤٤٪ فى صفة المواد الصلبة الذائبة، و ٣٤٪ فى صفات pH الثمرة. أما بقية التباينات فى كل صفة فقد أرجعت إلى العوامل التالية

١ – أخطاء فى القياس.

٢ – مواقع كمية أخرى ذات تأثير صغير جدًا إلى درجة لم يمكن معها التعرف عليها بثقة فى عشيرة بهذا الحجم.

٣ – التفاعلات بين مواقع الجينات الكمية، حيث كانت تلك التفاعلات أضعف من أن يمكن التعرف عليها.

٤ – التفاعلات بين التراكيب الوراثية المفردة والبيئة (عن Young ١٩٩٦).

ولقد أمكن باستخدام مختلف طرق تقنيات الدنا تحديد مواقع أكثر من ١١٠٠ جينًا (حتى عام ١٩٩٥) على كروموسومات قمح الخبز (٤٢ كروموسوم)، كذلك حدثت تقدمات كبيرة مماثلة فى رسم الخرائط الوراثية الجزيئية فى محاصيل عديدة متنوعة، مثل: الذرة، والطماطم، والقطن، والأرز، والتبغ، والشعير، ولفت الزيت، ودوار الشمس (جدول ٩–٢)

ولاقى تحديد مواقع الجينات أكبر استعمال له فى مجال التربية لمقاومة الأمراض (جدول ٩–٣)، حيث أفاد – خاصة – فى تعريف مواقع أكثر من جين للمقاومة للمسبب المرضى الواحد، فيما يعرف باسم gene pyramiding، الأمر الذى يستحيل تحقيقه إلا فى وجود كافة سلالات المسبب المرضى التى تقاومها تلك الجينات (عن Law ١٩٩٥).

جدول (٩-٢): بعض الصفات الكمية التى تتحدد جيناتها بالـ QTL analysis (عن Chopra ٢٠٠٠).

المحصول	الصفة	عدد المواقع الجينية للصفة	قدر الاختلافات المظهرية التى أمكن تفسيرها (%)
الذرة	ارتفاع النبات	٦	٧٣
	محصول الحبوب	٦	٦١
الطماطم	محتوى المواد الصلبة	٤	٤٤
	كتلة الثمرة (وزنها)	٦	٥٨
	pH الثمرة	٥	٤٨
الأرز	المقاومة للعصفة	١٠	٧٦
	موعد تكوين السنبلة	٥	٨٤
الفاصوليا العادية	المقاومة للفحة البكتيرية العادية	٧	٧٥
	عدد عقد الرايزوبيم الجذرية	٤	٥٠
فاصوليا المنج	وزن البذرة	٤	٥٠
	المقاومة للبياض الدقيقى	٣	٥٨
البسلة	المقاومة للفحة أسكوكيتا	٣	٧١
البطاطس	لون الشبس	٦	٥١
القطن	طول التيلة	٣	٣٠,٩
	استطالة التيلة	٢	٢١,١
فول الصويا	ارتفاع النبات	٢	٧٦,٧
	الرقاد	٣	٥٦,٤

كما أفادت المعلمات الجزيئية فى تحديد مواقع عديد من جينات المقاومة للحشرات. ومن أمثلة ذلك ما يلى (عن Duck & Evola ١٩٩٧).

الحشرة التى يتوفر لها جين المقاومة	المحصول
green leafhopper	الأرز
Russian wheat aphid	الشعير
bruchid	فاصوليا المنج
gall midge	الأرز
trichome-mediated resistance	البطاطس
European corn borer	الذرة

جدول (٩-٣): بعض الأمثلة لمعلمات جزيئية ترتبط بصفات المقاومة للأمراض والآفات فى بعض المحاصيل الزراعية (عن Chawla ٢٠٠٠).

المحصول		الآفة أو المسبب المرضى	جين المقاومة	المعلم الجزيئى
الأرز	Rice	*Pyricularia oryza*	Pi2(t), Pi-4(f)	RFLP
			Pi-10(t)	RAPD
		Xanthomonas oryzae	Xa21	RAPD
			Xa3, Xa4, Xa10	RFLP & RAPD
		Orseolia oryzae	Gm2, Gm4t	RAPD
القمح	Wheat	*Puccinia recondita*	Lr9, Lr24	RFLP & RAPD
		Erysiphe graminis	Pm1, Pm2, Pm3	RFLP
		Hessian fly	H21	RAPD
الذرة	Maize	Leaf blight	rhm	RFLP
الشعير	Barley	Stem rust	Rpg 1	RFLP
		Barley yellow mosaic	ym4	RFLP
		Rhyncosporium secalis and barley mild mosaic virus		RFLP
		Erysiphe graminis		RFLP
لفت الزيت	*Brassica napus*	*Leptosphaeria maculans*		RFLP
البسلة	Pea	*Erysiphe polygoni*		RFLP
فاصوليا المنج	Mungbean	Bruchid *Callosobruchus*		RFLP
الطماطم	Tomato	*Fusarium oxysporum*		RFLP
		Cladosporium fulvum		RFLP
البطاطس	Potato	Cyst nematode		RFLP

التطبيقات العملية فى مجال تسهيل إجراء وزيادة كفاءة برامج التربية

يستفاد من المعلمات الجزيئية فى مجال تربية النبات فى الأمور التالية:

١ – الانتخاب المبنى على الارتباط بين الصفات المراد الانتخاب لها ومعلمات جزيئية خاصة، وهو ما يعرف باسم marker-assisted selection.

٢ – إسراع عملية التلقيح الرجعي – وخاصة عند الرغبة في نقل الجينات من نوع لآخر – بالاعتماد على ارتباط الصفات التي يُراد نقلها بمعلمات جزيئية.

٣ – عمل بصمات وراثية (بصمة الدنا) لمختلف السلالات والأصناف النباتية، بما يفيد في حفظ حقوق المربي

٤ – تقدير مدى التقارب أو التباعد الوراثي بين التراكيب الوراثية (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢) والتعرف على التباينات الوراثية في الصفات المرغوب فيها.

٥ – اختبار نقاوة السلالات، والهجن، ولوطات البذور، وتحديد هويتها

٦ – اختيار الآباء المناسبة للهجن في برامج التربية لإنتاج الأصناف الهجين، وعشائر الأساس لبرامج الانتخاب

٧ – انتخاب التراكيب الوراثية المتميزة المقاومة أو القادرة على تحمل ظروف الشدّ البيئي أو المرضي أو الحشري .. إلخ

٨ – إجراء الانتخاب المبكر للصفات ذات درجات التوريث المنخفضة (عن Swarp & Swarp ١٩٩٣)

٩ - تحديد التراكيب الوراثية التي تحتوي على جين استعادة الخصوبة (عن Chawla ٢٠٠٠).

١٠ – عمل خرائط وراثية ذات كثافة عالية high density maps (مشبعة saturated) للمحاصيل الزراعية يمكن أن تسمح بتقييم كل جزء من الكروموسوم على مستوى جزئ الدنا، وبما يسهل على المربي – كثيرًا – مهمة التربية لتحسين الصفات الكمية، وذلك بتزويده بمعلومات عما يلي:

أ – عدد العوامل الوراثية المؤثرة في الصفة الكمية المعنية.

ب – المواقع الكروموسومية لتلك الجينات، الأمر الذي يستحيل تحقيقه بالطرق الكلاسيكية.

جـ – الأهمية النسبية لكل جين في التأثير على الصفة

فيمكن عن طريق المعلمات الجزيئية 'molecular 'tags – للجينات المتحكمة في الصفات الكمية quantitative trait loci – تتبع الجينات في الأجيال الانعزالية، مع المساعدة في إجراء الانتخاب للجينات المعنية.

د – الانتخاب المبكر للانعزالات فائقة الحدود لأجل إسراع عملية تطوير الأصناف الجديدة وزيادة كفاءة عملية الانتخاب، ويعد هذا الأمر غاية في الأهمية خاصة – بالنسبة للصفات الكمية

هـ – نقل الجينات من الجيرمبلازم البرى بقصر عملية النقل على أجزاء صغيرة من الكروموسومات تحتوى على الجينات المرغوب فيها بدلا من اللجوء إلى التهجينات النوعية

و – تحقيق ما يعرف باسم تجميع الجينات المتماثلة في تأثيرها gene pyramiding في تركيب وراثي واحد، الأمر الذى يصعب تحقيقه بالاعتماد على التحليل المظهرى.

١١ – عزل الجينات وإكثارها، ونقلها إلى التراكيب الوراثية المرغوب فيها.

١٢ – مقارنة الخرائط الجزيئية للأنواع النباتية المختلفة لأجل التعرف على العلاقة التطورية بينها (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

١٣ – تحسين الصفات النوعية :

عرفت واستخدمت ارتباطات بين معلمات جزيئية وصفات نوعية هامة، مثل الارتباطات التي وجدت بين معلمات RFLP والجين Fan الخاص بمحتوى حامض اللينولينك في فول الصويا، وتلك التي وجدت بين معلمات الـ RAPD والتحكم في تكوين الأجنة الجسمية في البرسيم الحجازى (عن Chawla ٢٠٠٠)

١٤ – تحسين الصفات الكمية :

على الرغم من كثرة الدراسات التى أجريت على وراثة الصفات الكمية بالاعتماد على التحاليل الوراثية الكمية، فإن مربى النبات لا يتحصل من تلك الدراسات على معلومات عن :

أ – عدد العوامل الوراثية التى تتحكم فى تلك الصفات.

ب – مواقع الجينات على الكروموسومات.

جـ – مقدار الإسهام النسبى لكل من تلك الجينات فى التأثير على الصفة

وتوفر تقنيات المعلمات الوراثية الجزيئية فهما أفضل لجميع تلك الأمور، كما أنها تعطى المربى أداة قوية لرسم الخريطة الكروموسومية ولإحكام التعامل مع كل من الجينات المفردة التى تتحكم فى تلك الصفات الكمية، كما أنها توفر فهمًا لظواهر التفوق

epistasis، والتأثيرات المتعددة للجين pleiotropy، والأساس الوراثى لقوة الهجين heterosis ومن خلال تلك المزايا التى توفرها تقنيات المعلمات الوراثية الجزيئية للمربى فإنها يمكن أن تساعده بقوة فى تحقيق عملية الانتخاب للصفات المرغوبة بكفاءة عالية (١٩٩٢ Stuber)

١٥ – التربية لمقاومة الأمراض:

على الرغم من التقدم الهائل الذى حدث فى مجال التربية لمقاومة الأمراض والآفات، فإن مصاعب كثيرة تكتنف عملية الانتخاب للمقاومة، التى تتطلب إما إجراء عدوى صناعية، وإما الاعتماد على الأوبئة الطبيعية (أى ضرورة التعامل مع مسببات الأمراض ذاتها فى برامج التربية)، وما يرتبط بذلك من مشاكل جمة ليس أقلها ضرورة وصول المسبب المرضى أو الآفة لجميع النباتات المختبرة حتى لا تحدث حالات إفلات من الإصابة، وضرورة عدم زيادة مستوى المسبب المرضى أو الآفة عن الحد الذى يؤدى إلى كسر المقاومة، مع التنبيه إلى ما يمكن أن تحدثه العوامل البيئية من تأثيرات على أى من العائل أو المسبب المرضى. هذا إلى جانب أن الانتخاب للمقاومة بطرق التربية العادية يصعب معه – إن لم يستحيل أحيانًا – الاختبار للمقاومة لعدد من مسببات الأمراض أو الآفات فى آن واحد.

أما الاعتماد على الانتخاب الذى يجرى بمساعدة المعلمات الوراثية الجزيئية الشديدة الارتباط بجينات المقاومة المرغوب فيها فإنه يسمح بإجراء الانتخاب للمقاومة لعدة مسببات مرضية أو آفات فى آن واحد دونما حاجة لإجراء أى عدوى صناعية، أو الحاجة إلى نقل المسبب المرضى من مكان لآخر (الأمر الذى قد تمنعه قوانين الحجر الزراعى)، ولا يحتاج الأمر إلاّ إلى جزء يسير من النسيج النباتى من كل نبات يُراد اختباره، أما اختبارات المقاومة بالعدوى الصناعية فإنه يمكن تأجيلها إلى الأجيال المتأخرة من برنامج التربية ويعطى جدولا (٩-٤)، و (٩-٥) أمثلة على معلمات جزيئية ترتبط بصفات المقاومة لبعض الأمراض أو الآفات فى النباتات (عن Kelly ١٩٩٥، و Chawla ٢٠٠٠)، كما يعطى Michelmore (١٩٩٥) مزيدًا من الأمثلة على حالات مقاومة كمية للأمراض فى عدد من المحاصيل الحقلية ومحاصيل الخضر.

جدول (٩-٤): أمثلة لبعض جينات المقاومة للأمراض والآفات التي ترتبط بمعلمات جزيئية متنوعة (عن Michelmore ١٩٩٥).

المحصول		الآفة أو المسبب المرضي	جين المقاومة	المعلم الجزيئي
الطماطم	Tomato	*Meloidogyne incognita*	*Mi*	RAPD
			Mi3	RAPD, RFLP
		Leveillula taurica	*Lv*	RAPD, RFLP
		Oidium lycopersicon	*Ol1*	RAPD, RFLP
		Verticillium dahliae	*Ve*	RAPD
		Yellow leaf curl virus	*Tyl*	RFLP
البطاطس	Potato	*Globodera rostochiensis*	*H1*	RFLP
		Phytopluthora infestans	*R1 & R3*	RFLP
الخس	Lettuce	*Bremia lactucae*	*Dm17 & 18*	RAPD, SCAR
			Dm8 & 10	RAPD, SCAR
		Plasmopara lactucae-radicis	*Plr*	RAPD, RFLP
		Turnip mosaic virus	*Tu*	RAPD, RFLP
فول الصويا	Soybean	Soybean mosaic virus	*Rsv*	µsat., RFLP
الفاصوليا	Common bean	*Uromyces appendiculatus*	*Up2*	RAPD
		Common bean mosaic virus	*I*	RAPD
البسلة	Pea	Pea seed-borne mosaic virus	*Sbm-1*	RFLP, RAPD
		Pea common mosaic virus	*mo*	RFLP,
		Erysiphe polygoni	*er*	RAPD,
		Fusarium oxysporum	*Fw*	& µsat
الذرة	Maize	*Bipolaris maydis*	*rhm*	RFLP
الشعير	Barley	*Rhynchosporium secalis*	*Rh*	RAPD
		Erysiphe graminis f. sp. hordei	*Ml(La)*	RFLP
		Barley yellow mosaic virus	*ym4*	RFLP
الشوفان	Oats	*Puccinia graminis*	*Pg3*	RAPD
		Puccinia coronata	*Pc68*	RAPD
القمح	Wheat	*Heterodera avenae*	*Cre*	RFLP
		Puccinia recondita	*Lr9*	RAPD

جدول (٩–٥): قائمة جزئية ببعض المواقع الجينية التي حددت لبعض حالات المقاومة للأمراض (QTL)، باستخدام تقنية الـ RFLP (عن Young ١٩٩٦)

المحصول والمسبب المرضي	عدد الـ QTLs التي أمكن تحديدها	نسبة ما تتحكم فيه تلك الجينات من التباينات الكلية (%)	ملاحظات
الشعير: البياض الدقيقي *Erysiphe graminis*	٢	٢٠	
الفاصوليا العادية: اللفحة البكتيرية *Xanthomonas campestris*	٧	٧٥	وجد أن أحد الجينات كان قريبًا من الموقع المسئول عن عدد عقد الرايزوبيم
الذرة: تبقع الأوراق الرمادى *Cercospora zeae-maydis*	١٠<	٥٨	
البسلة: لفحة أسكوكيتا *Ascochyta pisi*	٣	٧١	
البطاطس: النيماتودا المتحوصلة *Globodera rostochiensis*	٢	١٤	لم يظهر دليل على التفاعل بين الجينات
البطاطس: الندوة المتأخرة *Phytophthora infestans*	١١		كانت كل الجينات خاصة بسلالات معينة
الأرز: العصفة *Pyricularia oryzae*	١٠	٧٦	
الطماطم: الذبول البكتيرى *Pseudomonas solanacearum*	٣	٨٢	
الطماطم: فيرس تجعد واصفرار أوراق الطماطم TYLCV	٣	—	وجد أن أحد الجينات كان قريبًا جدًا للجين Mi المسئول عن المقاومة لنيماتودا تعقد الجذور

ومن المزايا الهامة التى يمكن أن تحققها المعلمات الجزيئية فى مجال المقاومة للأمراض إحداث زيادة تدريجية فى أعداد الجينات الرئيسية والثانوية فى الأصناف التجارية؛ لأجل تطوير مقاومة قادرة على البقاء durable resistance، وهى العملية التى تعرف باسم "التهرم" أو "الإهرام" pyramiding. ومن المعروف أن مسببات الأمراض والآفات يمكنها التغلب على المقاومة التى يتحكم فيها جينات مفردة، ولكن عملية "إهرام" جينات المقاومة فى الصنف الواحد يجعل من الصعب على الآفة أو المسبب المرضى كسر المقاومة. وجدير بالذكر أن ذلك الأمر يتم بطرق التربية العادية بصورة غير مباشرة عن طريق اللجوء إلى الأصناف المتعددة السلالات التى تحتوى كل سلالة منها على أحد جينات المقاومة الخاصة بإحدى السلالات. أما "إهرام" جينات المقاومة - لنفس المسبب المرضى أو الآفة - فى الصنف الواحد فهو أمر يصعب تحقيقه بطرق التربية العادية نظرًا لصعوبة التعرف على جينات المقاومة الإضافية فى النبات اعتمادًا على تفاعل النبات مع المسبب المرضى أو الآفة فقط. أما عند اللجوء إلى الانتخاب المعتمد على المعلمات الجزيئية فإنه يمكن تتبع انعزالات جينات المقاومة الجديدة المضافة حتى فى وجود الجينات الأصلية؛ ومن ثم يمكن نقل عدة جينات للمقاومة من مصادر مختلفة إلى تركيب وراثى واحد. ومن الأمثلة الهامة التى استخدمت فيها تلك التقنية "إهرام" جينات المقاومة للفحة البكتيرية: Xal، و Xa3، و Xa4، و Xa5، و Xa10 فى الأرز.

١٦ - التربية لمقاومة الحشرات:

تحقق المعلمات الجزيئية عديدًا من المزايا فى التربية لمقاومة الحشرات، كما يلى:

١ - يمكن استعمالها فى تحديد عدد الجينات المسئولة عن المقاومة، ومدى إسهام كل منها فى الصفة.

٢ - يمكن استعمالها - بمجرد تحديدها - فى الاختبار للمقاومة فى غياب الحشرة.

٣ - تفيد كثيرًا فى الانتخاب للمقاومة الأفقية التى يتحكم فيها عديد من الجينات (عن Duck & Evola ١٩٩٧).

محددات الاعتماد على المعلمات الجزيئية فى تربية النبات

إن من أهم محددات استعمال المعلمات الجزيئية فى تربية النبات ما يلى

١ – احتياجها لوقت وجهد كبيرين لأجل إجراء التحليل الوراثى، وما يعنيه ذلك من تكلفة عالية.

٢ – عدم وجود تعدد آليلى polymorphism فى بعض المحاصيل، الأمر الذى يستلزم اللجوء إلى التلقيحات البعيدة جدًّا، وخاصة فى الأنواع الذاتية التلقيح، بما فى ذلك القمح

مصادر إضافية

لمزيد من المعلومات حول المعلمات الوراثية وتطبيقاتها فى مجال تربية النبات يراجع ما يلى

المرجع	الموضوع
Weeden (١٩٨٩)	تطبيقات الأيزإنزيمات فى تربية النبات
Helentjaris (١٩٩٢)	استخدام تحليل الـ RFLP فى دراسة الصفات النباتية الهامة
Stuber (١٩٩٢)	استخدام المعلمات الوراثية الكيميائية الحيوية والجزيئية فى تربية النبات
Bretting & Widrlechner (١٩٩٥)	المعلمات الوراثية وتطبيقاتها فى حفظ جيرملازم المحاصيل البستانية
Kelly (١٩٩٥)	استخدامات الـ RAPD فى التربية لمقاومة الأمراض التى يتحكم فيها جين رئيسى.
Michelmore (١٩٩٥)	استخدام المعلمات الوراثية الجزيئية فى مجال التربية لمقاومة الأمراض.
Lee (١٩٩٥)	استخدام معلمات الدنا فى برامج تربية النبات
Staub وآخرون (١٩٩٦)	استخدامات المعلمات الوراثية الجزيئية فى تربية النبات.
Young (١٩٩٦)	رسم خرائط جينات الصفات الكمية، وخاصة صفات المقاومة للأمراض
Kelly & Miklas (١٩٩٩)	استخدام المعلمات الجزيئية فى الانتخاب للصفات الهامة فى الفاصوليا
Charcosset & Moreau (٢٠٠٤)	استخدام المعلمات الجزيئية فى تربية الأصناف الجديده وتقييم التباينات الوراثية

الفصل العاشر

مقدمات فى الهندسة الوراثية

تمهيد

تُعَرَّف النباتات المحولة وراثيًا transgenic plants بأنها تلك التى تحمل جينات غريبة نقلت إليها – عادة – من كائنات لا تمت لها بصلة قرابة. تعرف العملية الكاملة التى تتضمن عملية إدخال الجين، ودمجه فى جينوم الكائن، والتعبير عنه فى ذلك الكائن العائل له باسم التحول الوراثى genetic transformation. وبالاعتماد على كل من تقنيات الدنا وطرق نقل الجينات، وتقنيات مزارع الأنسجة .. أمكن إنتاج النباتات المحولة وراثيًا بكفاءة فى أعداد كبيرة من المحاصيل الزراعية.

ولقد برزت تلك التقنية كأداة جديدة لإنجاز ما أصبح يعرف بالتربية للجين الواحد single gene breeding، أو التربية بالتحول الوراثى transgenic breeding. وعلى خلاف التربية الكلاسيكية، فإن الجين المرغوب فيه ينقل منفردًا، ومجردًا من أى جينات أخرى – مرغوبًا أو غير مرغوب فيها – قد تكون مرتبطة به. وبذا .. فإن الصنف المحول وراثيًّا – والذى يفترض أن يكون جيدًا – لا يحتاج إلى أى تلقيحات رجعية (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

وتاريخيًّا .. حُصل على أول نبات محول وراثيًّا – وكان قادرًا على نقل الجين المنقول إليه مندليًّا – فى عام ١٩٨١. وفى عام ١٩٩٤ سمحت وزارة الزراعة الأمريكية بالإنتاج التجارى لأول صنف محصولى حُوِّلَ وراثيًا، وهو صنف جديد من القطن عُدِّلَ وراثيًا ليكون مقاومًا لمبيد الحشائش bromoxynil. ويعد ذلك بقليل أعطى التصريح بإنتاج أول صنف لمحصول غذائى محول وراثيًا، وهو صنف الطماطم Flavr-Savr الذى تميز ببطء نضج ثماره (عن Owens ١٩٩٥).

وعلى الرغم من أن الغالبية العظمى لحالات التحول الوراثى التى أجريت على النباتات حتى الآن كانت باستعمال جين واحد أو جينين، فإنه أمكن فى حالات قليلة جدًا إجراء تحويل وراثى بعدد كبير من الجينات فى آن واحد. ومن أمثلة ذلك تحويل فول الصويا وراثيًا بـ ١٢ جينًا بطريقة القذف الدقيق، والحصول على نباتات أرز خصبة تحمل ١٣ جينًا نقلت إليها بتحويلات وراثية مستقلة (عن Bhat ٢٠٠٠)

وتتطلب الاستفادة من تقنيات الهندسة الوراثية فى الإنتاج التجارى للأصناف النباتية المحسنة وراثيًا، ما يلى:

١ – عزل الجين المعنى وإكثاره.

٢ – إجراء عملية التحول الوراثى والتأكد من تعبير الجين عن ذاته فى النوع المعنى بالتحويل.

٣ – إجراء الاختبارات الحقلية

٤ - تطوير صنف محسن يناسب الزراعة التجارية ويحتوى على الجين المنقول

٥ - توصيف الصنف وإجراء كافة الاختبارات اللازمة لتسجيله

٦ – قبول الصنف الجديد من جمهور المستهلكين

٧ تسويق الصنف الجديد (Horsch ١٩٩٣)

هذا ومن المعروف أن تركيب الجينات ونشاطها على المستوى الجزيئى لا يتحدد فقط بشفرته الوراثية، وإنما – كذلك – بتتابعات أخرى بالدنا تحدد الجزء من النبات الذى يحدث فيه التعبير الجينى ووقت حدوث ذلك التعبير، ومعدل حدوثه، وهى التعليمات الوراثية التى تتحدد بما يعرف باسم الـ promoter region للجين، والتى تتضمن التتابعات المحفزة enhancer sequences التى تُملى أى الأنسجة، وأى مراحل التكوين التى يحدث فيها – وعندها – التعبير الجينى.

إن الـ promoters الخاصة بالجينات المنقولة من مصادر غير نباتية لا يعبر عنها – غالبا – بصورة مرضية فى النباتات؛ مما يستلزم عزل promoters مناسبة لذلك ويتيسر حاليًا مجموعة من الـ promoters التى يقود بعضها إلى زيادة فى تعبير الجين وهو فى موقعه الجديد فى النبات المحول وراثيًا.

وحتى بعد التحول الوراثى الناجح، فإن الخلايا أو النباتات الناتجة يجب أن تقيم لأجل تحديد النباتات المحولة وراثيًا وتمييزها عن تلك التى لم يحدث بها تغيير. ولذا يجب إيجاد علاقة بين الجين المنقول وجين آخر تسهل ملاحظته، وهو الذى يعرف باسم reporter gene

وتعرف حزمة الجينات التى تشمل الجين المنقول - والذى يعرف باسم structural gene - والـ promoter gene، والـ reporter gene باسم gene construct.

وبالإضافة إلى التحويل الوراثى للأنواع النباتية المزروعة، فإن الهندسة الوراثية أصبحت تستخدم - على نطاق واسع - لأجل إنتاج مركبات كيميائية معينة يمكن أن تستعمل فى مجالات عدة عن طريق التحويل الوراثى للكائنات الدقيقة التى تُنمىَ على نطاق واسع لأجل إنتاج تلك المركبات، وهو ما أصبح يعرف باسم molecular pharming، أى الزراعة الجزيئية لأجل إنتاج المركبات الصيدلانية (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

ونقدم - فيما يلى - عرضًا لأبرز الإنجازات التى أسهمت فى تطور الهندسة الوراثية فى مجال الإنتاج النباتى:

السنة	الموضوع
١٩٨٠	أول نقل للدنا البكتيرى من *Agrobacterium tumefaciens* إلى النبات
١٩٨٣	توفر الـ **selective markers**
	تجريد الـ **Ti plasmid** من قدرته على إحداث النمو السرطانى
	أول تحويل وراثى باستعمال البروتوبلاست النباتى
١٩٨٥	هندسة نباتات مقاومة لمبيدات الحشائش
١٩٨٦	هندسة نباتات مقاومة للفيروسات
	أول تقييم حقلى لنباتات محولة وراثيًا
١٩٨٧	هندسة نباتات مقاومة للحشرات
	التحويل الوراثى بالقذف الدفعى الدقيق
١٩٨٨	التحكم فى نضج ثمار الطماطم بطريق الهندسة الوراثية
١٩٨٩	إنتاج أجسام مضادة فى النباتات بطريق الهندسة الوراثية
١٩٩٠	إحداث العقم الذكرى النباتى بطريق الهندسة الوراثية
١٩٩١	هندسة نباتات بمحتوى كربوهيدراتى معدل

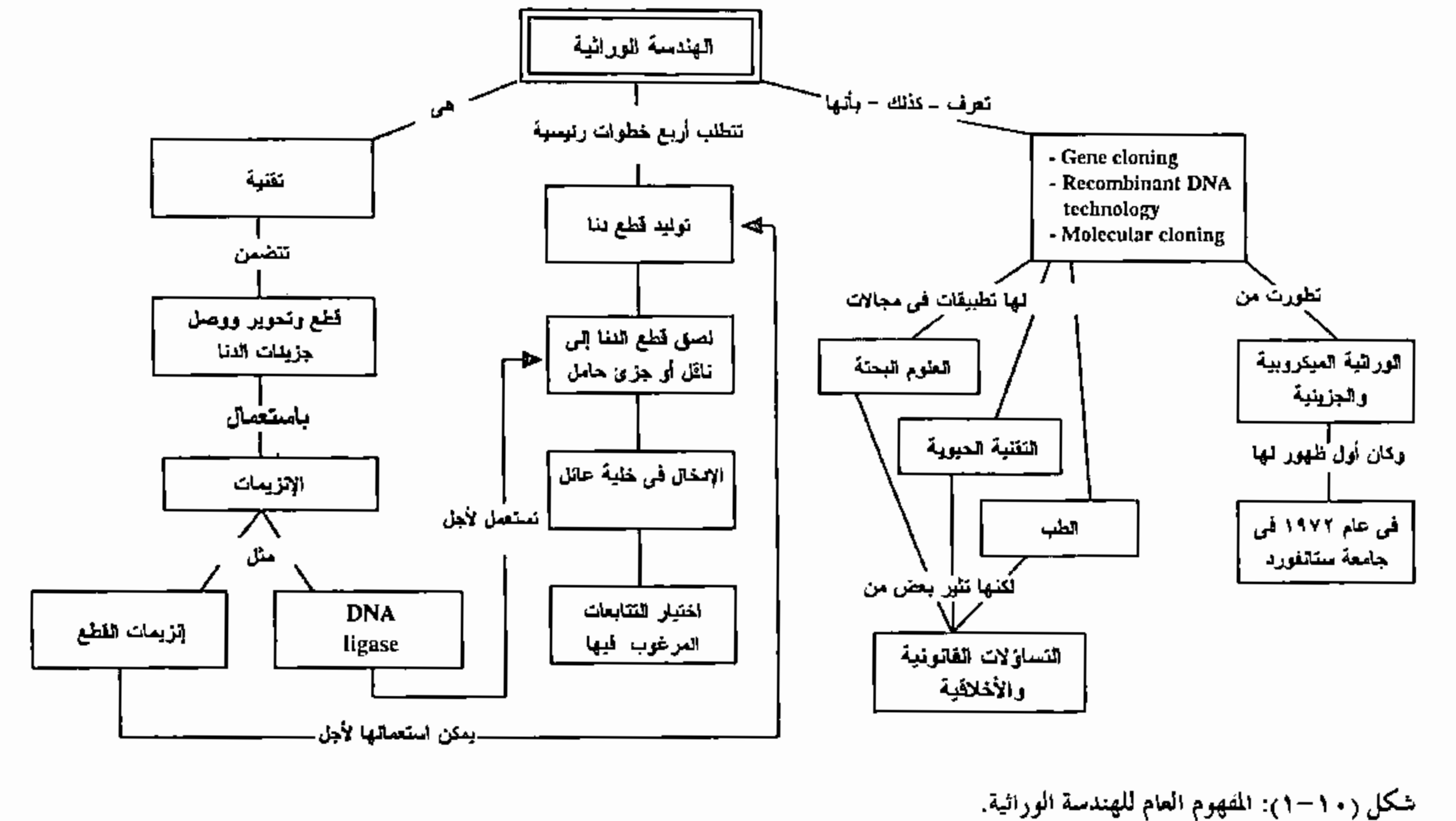
السنة	الموضوع
١٩٩٢	هندسة نباتات بمحتوى معدل من الأحماض الدهنية
	تحويل القمح وراثيًّا بطريق القذف الدفعي الدقيق
	إنتاج نباتات محولة وراثيًا قادرة على إنتاج بلاستيك يمكن أن يتحلل بيولوجيًا
١٩٩٤	إنتاج أول محصول غذائى معدل وراثيًّا (صنف الطماطم FlavrSavr)
١٩٩٨	نقل أكثر من ١٠ جينات – كل على انفراد – إلى نبات واحد
	اعتماد أكثر من ٤٨ صنف محول وراثيًّا على المستوى العالمى
	إنتاج أرز محول وراثيًا أعلى في قيمته الغذائية
	زراعة أكثر من ٤٠ مليون هكتار (>٩٥ مليون فدان) – على المستوى العالمى – بالمحاصيل المعدله وراثيًا
١٩٩٩	إجراء أكثر من ٩٠٠٠ تجربة تقييم حقلية على المحاصيل المعدلة وراثيًّا

هذا .. وللتفاصيل المتعلقة بالمراجع الخاصة بتلك الإنجازات .. يراجع Kempken (٢٠٠١)، كما أننا سنتطرق إلى تفاصيل جميع تلك الأحداث – وغيرها – في الفصول التالية من هذا الكتاب.

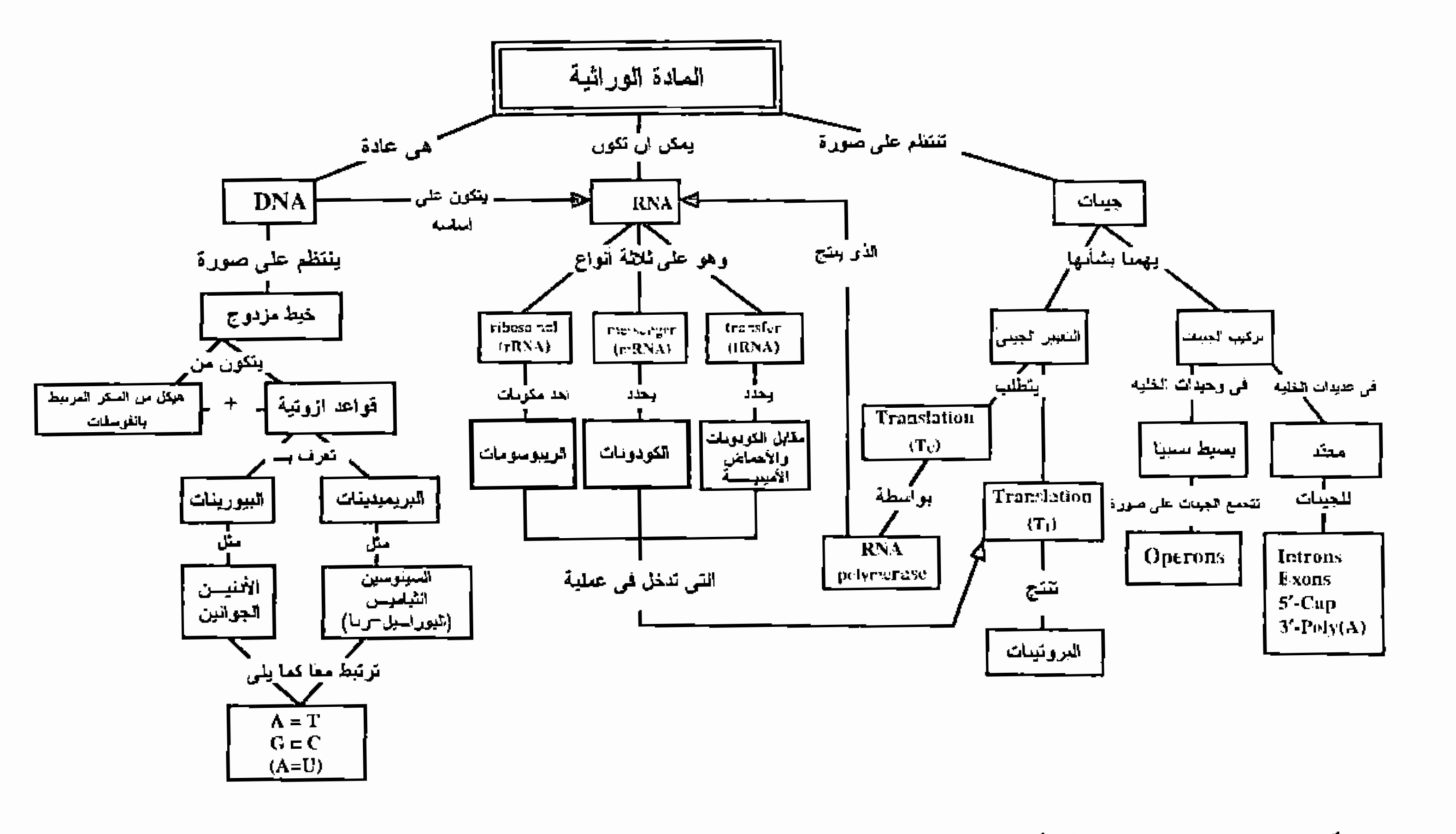
المفهوم العام للهندسة الوراثية

نقدم – فيما يلى – (نقلاً عن Nicholl ١٩٩٤) موجزًا للمفهوم العام للهندسة الوراثية فى صورة ثلاثة أشكال تخطيطية، يوضح الأول (شكل ١٠–١) عرضًا لماهية الهندسة الوراثية، والثانى (شكل ١٠–٢) عرضًا لماهية المادة الوراثية التى تُخضع لتقنيات الهندسة الوراثية، والثالث (شكل ١٠–٣) عرضًا لمختلف تطبيقات الهندسة الوراثية

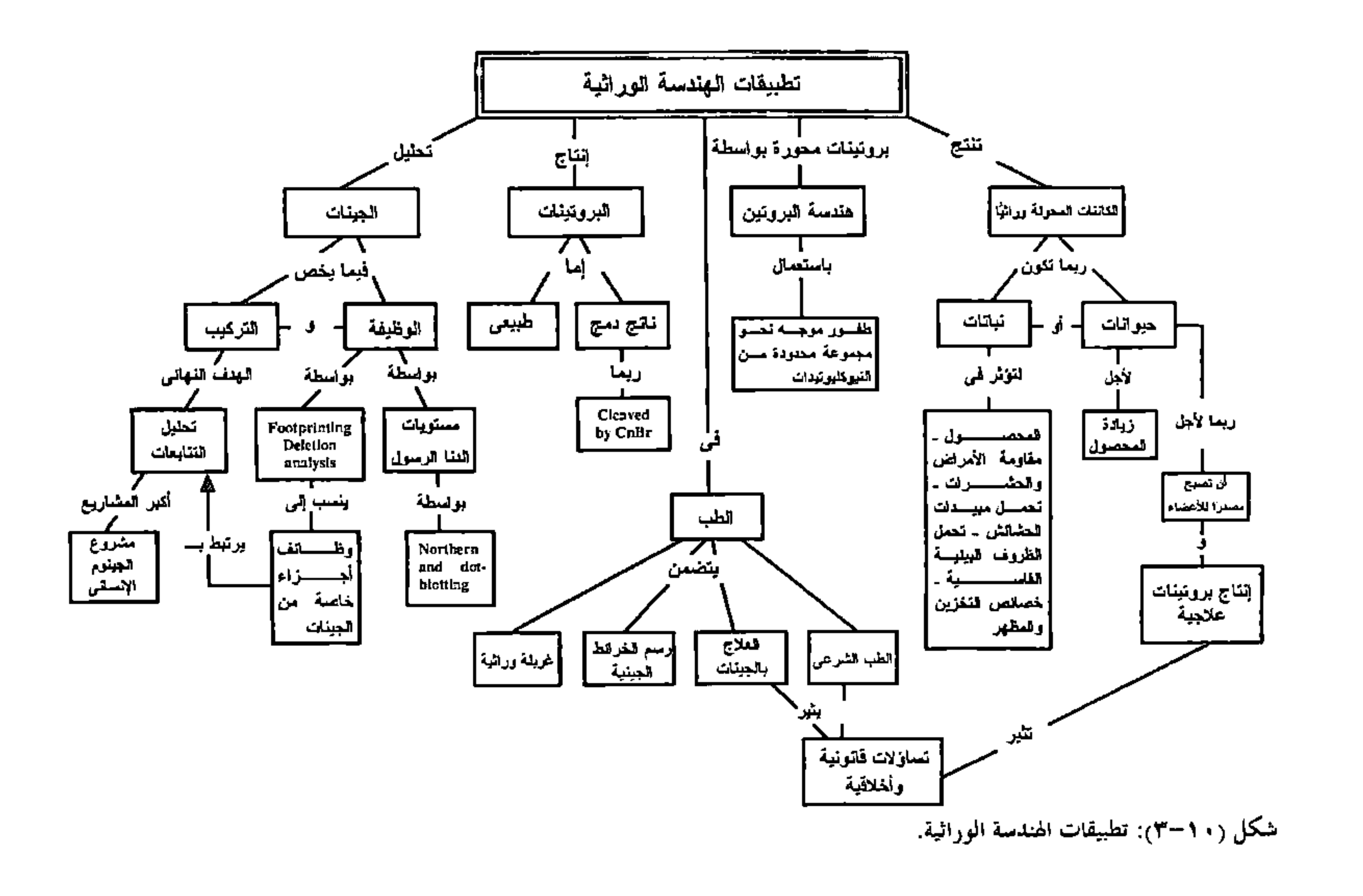
هذا .. ويلخص شكل (١٠–٤) خطوات استعمال الهندسة الوراثية فى تحويل النباتات وراثيًّا بجينات غريبة عنها (عن Hopkins ١٩٩٥).



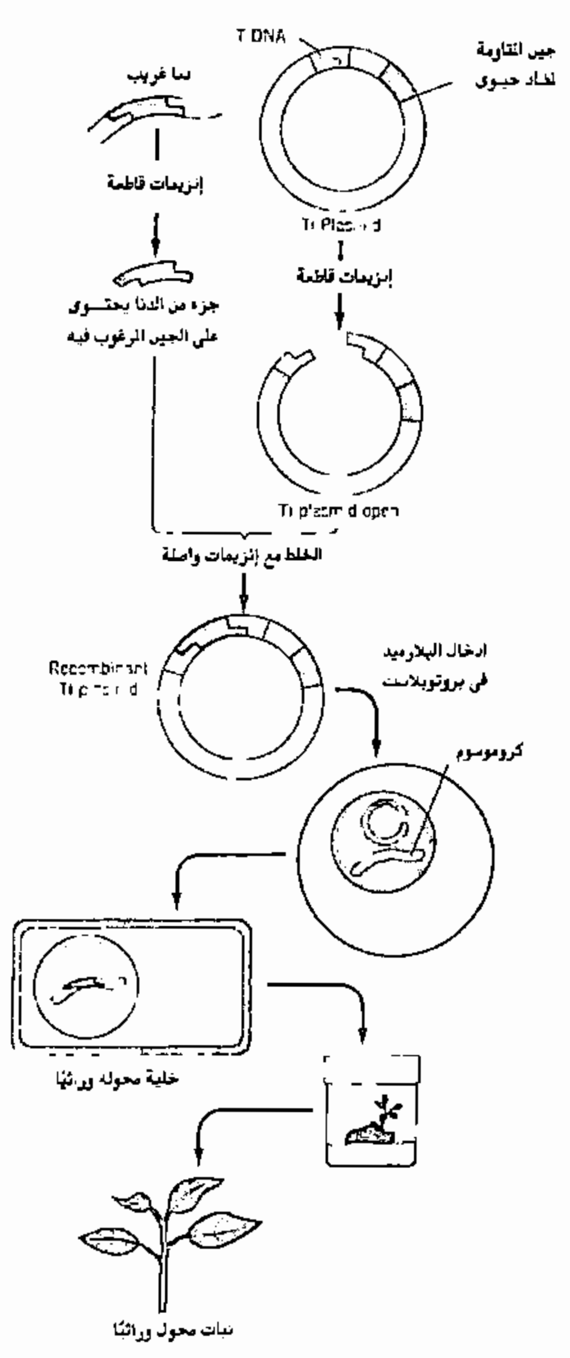
شكل (١٠-١): المفهوم العام للهندسة الوراثية.



شكل (١٠-٢) المادة الوراثية التى تخضع لتقنيات الهندسة الوراثية



شكل (١٠-٣): تطبيقات الهندسة الوراثية.



شكل (١٠-٤): ملخص لخطوات استعمال الهندسة الوراثية فى تحويل النباتات وراثيًا بجينات غريبة عنها.

ولقد استخدمت البكتيريا *A. tumfaciens* – على سبيل المثال – فى نقل جينات من مصادر مختلفة إلى الطماطم، منها جينات من أصناف أخرى من الطماطم، ومن البكتيريا والفيروسات، والبقوليات، والذرة، ومن نباتات أخرى من العائلة الباذنجانية (عن Fobes ١٩٨٧).

وتتميز الفيروسات – كذلك – بقدرتها على إصابة النباتات ونقل أحماضها النووية إلى عوائلها، لذا .. فإنها تستخدم هى الأخرى لأغراض الهندسة الوراثية، ويستفاد فى هذا الشأن من الفيروسات التى يكون حامضها النووى من نوع دى إن إيه DNA سواء أكانت مزدوجة الخيط double-stranded DNA (مجموعة Caulimovirus التى يعرف منها عديدًا من الفيروسات، مثل فيرس موزايك القنبيط Cauliflower Mosaic Virus الذى يتكون من رنا مزدوج الخيط double-stranded DNA ويصيب نباتات العائلة الصليبية بصفة أساسية) أو مفردة الخيط Single–stranded DNA (مثل فيروسات مجموعة الجمنى gemini viruses، التى يوجد منها عديد من الفيروسات، منها فيرس موزايك الفاصوليا الذهبى، وفيرس تخطيط الذرة).

ولكن يعاب على استخدام الفيروسات فى مجال الهندسة الوراثية أنه لم يمكن إضافة قطعة دنا كبيرة إلى الحامض النووى الخاص بالفيرس دون التأثير فى قدرته على إصابة العائل، وهى الخطوة الضرورية لإحداث التحول المطلوب. كما أن الجينات الصغيرة المضافة تبطئ حركة الفيرس من خلية إلى أخرى، ويرجع ذلك إلى أن الحامض النووى الخاص بالفيرس صغير بطبيعته فهو لا يتعدى واحدا من ثلاثين جزءًا من الـ Ti plasmid (Kado ١٩٨٢).

وقد تبين أن دنا فيرس موزايك القنبيط يحمل ستة جينات، ليس لأحدها (وهو الجين رقم II) ضرورة بالنسبة لتكاثر الفيرس، أو تمثيل بروتين الفيرس، أو حركة الفيرس من خلية إلى أخرى، ولكنه يؤثر فى عملية الانتقال الحشرى الفيروسى فى الطبيعة، ويعد هذا الجين موقعًا مناسبًا لإضافة الجينات المرغوب فيها إلى دنا الفيرس. كما وجدت منطقة كروموسومية أخرى من دنا الفيرس (هى الجين رقم VI) تتحكم فى شدة أعراض المرض، حيث يؤثر أى تغيير فى هذه المنطقة كثيرًا على شدة الأعراض.

ووجد أن أعراض الإصابة بالفيرس ، قد تلاشت تقريبًا حينما أضيفت ١٢ نيكليوتيدة فى هذا الموقع الجينى. ونمت النباتات التى تمت عدواها بهذه الطفرة من الفيرس بصورة طبيعية (Shepherd وآخرون ١٩٨٢)

الجينوم الإنسانى والجينومات النموذج

الجينوم الإنسانى

بدأت فكرة رسم خريطة شفرة الجينوم الإنسانى فى منتصف ثمانينيات القرن العشرين. ومع نهاية ذلك العقد كان قد تحقق لهذا المشروع ما يكفى من قوة الدفع للتفكير جديًا فى تنفيذه وقد جاءت البداية من الولايات المتحدة حيث بدأ مشروع الجينوم الإنسانى Human Genome Project – رسميًا – فى أكتوبر ١٩٩٠. ومع تكوين جمعية الجينوم الإنسانى Human Genome Organisation فى العام ذاته أخذ المشروع طابعًا دوليًّا، حيث كان الهدف من تلك الجمعية هو تنسيق الجهود التى بذلها العلماء فى هذا الخصوص فى عديد من دول العالم.

ولقد كان الهدف هو الانتهاء من المشروع فى بدايات القرن الحادى والعشرين، إلاّ أنه انتهى فعليًّا فى عام ٢٠٠٠. ومن خلال هذا المشروع أمكن التعرف على نحو ١٠٠٠٠٠ جين فى الجينوم الإنسانى، ولكن هذه الجينات لم تمثل سوى ٥٪ من الدنا الجينومى الذى قدر أنه يحتوى على نحو ثلاثة بلايين زوج من النيكيلوتيدات.

الجينومات النموذج أو الموديل

إلى جانب الجينوم الإنسانى، فقد بدأ العلماء – كذلك – وقاموا بتطوير موديلات جينومية أخرى تمثل كل منها مجموعة من الكائنات، مثل جينومات كل من

١ – البكتيريا *E. coli*.

٢ – الخميرة (الفطر) *Saccharomyces cerevisiae*.

٣ – النيماتودا *Caenorhabditas elegans*.

٤ – النبات *Arabidopsis thaliana*.

٥ – الحشرة *Drosophila melanogaster*.

٦ – الفأر.

٧ – الخنزير (عن Nicholls وآخرين ١٩٩٤).

الجينوم النباتى الموديل أرابيدوبسس ثاليانا

على الرغم من أن تحسين النباتات بطرق الهندسة الوراثية يمكن أن يعتمد على نقل جينات إليها من أى كائن حىّ، فإن النباتات تبقى هى المصدر الرئيسى لتلك الجينات، ولمّا كان التعامل مع النباتات على مستوى الدنا ليس بالسهولة التى يكون عليها التعامل مع الكائنات الدقيقة، لذا .. كان الاتجاه نحو اختيار نبات "موديل" يسهل التعامل معه ويتم التركيز عليه للتعرف على جينومه الكامل.

ونظرًا لما يتمتع به النبات *Arabidopsis thaliana* من مزايا عديدة تجعل التعامل معه أمرًا ميسورًا عن غيره من النباتات الراقية، فقد اختير ليكون هو النبات "الموديل"، حيث تناوله الكثير من الباحثون فى عديد من دول العالم بالدراسة المفصلة جزيئيًّا، وربط ذلك بالمستوى الخلوى، وبنموه وتطوره، وبصفاته المميزة. وحاليًّا .. يعتبر هذا النبات كائن قنطرى لإسراع تطوير نباتاتنا الاقتصادية وراثيًّا، حيث يُستعان بجيناته الهامة فى تطوير الأنواع النباتية الأخرى، إما بنقلها بصورة مباشرة إلى الأنواع الأخرى، وإما باستعمالها فى التعرف على الجينات المثيلة لها فيها (عن Flavell ١٩٩٢).

يعتبر *A. thaliana* أحد نباتات العائلة الصليبية (الكرنبية) الذى طالما استخدم فى الدراسات الوراثية الكلاسيكية لمدة تزيد عن أربعة عقود، ولكنه لم يصبح أحد أهم الكائنات المستخدمة فى البحوث الوراثية إلاّ منذ منتصف ثمانينيات القرن الماضى حينما أتضح أن الهيئة الكروموسومية لهذا النبات صغيرة للغاية، ولا تحتوى – تقريبًا – على أى دنا مكرر كذلك الذى ينتشر ويتوزع بطول الكروموسومات فى الأنواع الأخرى. وقد برز *A. thaliana* منذئذٍ كموديل مناسب للدراسات الوراثية فى المملكة النباتية، مثل دراسة وتحليل العمليات الأيضية، والتطور، والاستجابة لمختلف عوامل الشدّ البيئى، والمقاومة للأمراض والحشرات ... إلخ.

ومن أهم مميزات *A. thaliana*، ما يلى:

١ – النبات صغير الحجم (٢٥–٣٠ سم)، ويعد أصغر النباتات الراقية المعروفة؛ وبذا يمكن زراعة أعداد كبيرة منه فى حيز صغير فى حجرات النمو.

٢ – تأقلمه على ظروف بيئية متباينة.

٣ – يكمل النبات دورة حياته خلال فترة زمنية قصيرة تبلغ حوالى ٥–٨ أسابيع.

٤ – يُنتج النبات أعدادًا كبيرة من البذور تصل إلى ٤٠٠٠٠ بذرة للنبات الواحد.

٥ – يستجيب النبات لمختلف طرق التحول الوراثى المعروفة.

٦ – الصغر الشديد للهيئة الكروموسومية للنبات، وهى التى تقدر بنحو ٧ × ١٠^{٧} أزواج من النيكليوتيدات؛ وبالمقارنة .. فهى تبلغ نحو ٢٠ ضعف حجم الهيئة الكروموسومية للبكتيريا *E. coli*، وحوالى $^{١}/_{١٠٠}$ من حجم الهيئة الكروموسومية للذرة.

٧ – لا يوجد بالهيئة الكروموسومية سوى القليل جدًا من الدنا المكرر المنتشر هنا وهناك على امتداد الكروموسومات؛ فنجد أن التتابعات الفريدة (التى لا نظير لها) للدنا تبلغ – فى المتوسط – حوالى ١٢٠٠٠٠ ألف زوج من النيكيلوتيدات طولاً فى *A. thaliana*، مقارنة بنحو ١٠٠٠ زوج منها طولاً فى الذرة.

٨ – النبات ثنائى التضاعف.

٩ – يتلقح النبات ذاتيًا فى الطبيعة، مع نسبة ضئيلة جدًا من التلقيح الخلطى.

ومن أهم عيوب استخدام *A. thaliana* فى الدراسات الوراثية الصغر الشديد لحجم أزهاره؛ الأمر الذى يتطلب استخدام العدسات المكبرة لأجل خصيها وتلقيحها عند الرغبة فى إجراء التهجينات (عن Gardner وآخرين ١٩٩١، و Coury & Feldman ١٩٩٨).

ولقد بدأ تحليل جينوم *A. thaliana* فى عام ١٩٩٠، واستكمل رسميًا فى ديسمبر من عام ٢٠٠٠.

بلغ إجمالى عدد الجينات للبنات *A. thaliana* – بعدما اكتملت دراسة جينومه – حوالى ٢٦٠٠٠ جين (حوالى ١١٦ مليون نيكيلوتيدة). وعلى الرغم من أن هذا العدد لا يقل بدرجة كبيرة عما فى عديد من النباتات الزراعية الهامة، إلاّ أن صغر الحجم

الكامل للدنا فى هذا النبات أسهم فى مهمة دراسته تفصيليًا. فمثلاً يزيد حجم الدنا فى نباتات مثل التبغ والقمح بمقدار ٢٠، و ٦٠ ضعف حجم الدنا فى الـ *Arabidopsis* – على التوالى – مما يجعل من الصعوبة بمكان البحث عن الجينات فى هذه الكمية الزائدة من الدنا.

وعلى الرغم من أن جينوم الـ *Arabidopsis* يزيد عن جينوم *Escherichia coli* بمقدار ٢٥ ضعف فقط، فإن النبات أكثر تعقيدًا بكثير من البكتريا، وهو يقوم بأداء العمليات الحيوية ذاتها التى يقوم بها أى نبات آخر. وفى الواقع .. فإن الـ *Arabidopsis* والإنسان يحتويان – تقريبًا – على نفس العدد من الجينات.

أما عن وظائف تلك الجينات فقد تعرف العلماء على دور الكثير منها، ولكن يبقى نحو ١٥٠٠٠ جين لا تعرف وظائفها على وجه التحديد. ويحاول العلماء التعرف عليها من خلال خاصية قدرة بكتيريا *Agrobacteriun tumefacines* على زرع الدنا الذى تحمله (T-DNA) فى أى مكان من جينوم النبات؛ مما يترتب عليه ما اتفق على تعريفه باسم knockout mutant، حيث يختفى تأثير الجين الذى دمج فيه الـ T-DNA؛ لتظهر صفة جديدة لم تكن معروفة من قبل؛ وبذا .. يمكن التعرف على وظيفة الجين الذى يمكن تحديده بسهولة (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

ومن أهم الخصائص التى تم التوصل إليها بخصوص جينوم نبات *Arabidopsis thaliana* ما يلى (عن Kato وآخرين ٢٠٠٣).

أولاً: الدنا:

الطول	bp ١١٥٤٠٩٩٤٩
عدد الجينات	٢٥٤٩٨
كثافة الجينات	٤,٥ kb/جين
متوسط طول الجين	٢,٠١١ bp
متوسط طول الببتيد peptide	٤٣٤ aa
الـ exons	

متوسط الحجم	bp ٢٥٠
الـ introns	
متوسط الحجم	bp ١٦٨
متوسط العدد/جين	٤,١

ثانيًا: الـ proteome:

الأيض الخلوى	٢٢.٥٪
الـ transcription	١٦,٩٪
الدفاع plant defense	١١,٥٪
signaling	١٠.٤٪
النمو	١١,٧٪
مصير البروتين	٩,٩٪
الانتقال داخل الخلايا	٨,٣٪
الانتقال	٤ ٨٪
تمثيل البروتين	٤,١٪
المجموع	٦٩,٩٪

ويوضح جدول (١٠-١) توزيع تلك الجينات على كروموسومات النبات الخمسة (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

ولمزيد من التفاصيل عن جينوم *A. thaliana* .. يراجع Kato وآخرين (٢٠٠٣)، و Schmidt وآخرين (٢٠٠٣).

جدول (١٠-١): توزيع جينات النبات *Arabidopsis thaliana* على كروموسوماته الخمسة

الخصائص		كروموسوم ١	كروموسوم ٢	كروموسوم ٣	كروموسوم ٤	كروموسوم ٥	المجموع
الطول	Length (kbp)	٢٩١٠٥	١٩٦٤٧	٢٣١٧٣	١٧٥٥٠	٢٥٩٥٣	١١٥٤١٠
الذراع العلوى	Top arm (kbp)	١٤٤٤٩	٣٦٩٧	١٣٥٩٠	٣٠٥٢	١١١٣٢	
الذراع السفلى	Bottom arm (kbp)	١٤٦٥٦	١٦٠٤٠	٩٥٨٢	١٤٤٩٨	١٤٨٠٣	
عدد الجينات	Number of genes	٦٥٤٣	٤٠٣٦	٥٢٢٠	٣٨٢٥	٥٨٧٤	٢٥٤٩٨
الأكسونات:	*Exons:*						
العدد	Number	٣٥٤٨٢	١٩٦٣١	٢٦٥٧٠	٢٠٠٧٣	٣١٢٢٦	١٣٢٩٨٢
الطول الكلى	Total length (kbp)	٨٧٧٣	٥١٠٠	٦٦٥٥	٥١٥١	٧٥٧١	٣٣٢٤٩
النسبة من الطول الكلى	% of total length	٣٠	٢٦	٢٩	٢٩	٢٩	٢٩
المتوسط لكل جين	Average per gene	٥,٤	٤,٩	٥,١	٥,٢	٥,٣	
متوسط الحجم	Average size (bp)	٢٤٧	٢٥٩	٢٥٠	٢٥٦	٢٤٢	
الانترونات	*Introns:*						
العدد	Number	٢٨٩٣٩	١٥٥٩٥	٢١٣٥٠	١٦٢٤٨	٢٥٣٥٢	١٠٧٤٨٤
الطول الكلى	Total length (kbp)	٤٨٢٩	٢٧٦٨	٣٣٩٨	٣٠٣١	٤٠٣٠	١٨٠٥٦
النسبة من الطول الكلى	% of total	١٧	١٤	١٥	١٧	١٦	
متوسط الحجم	Average size (bp)	١٦٨	١٧٧	١٥٩	١٨٦	١٥٩	
كثافة الجينات	Gene density (kbp per gene)	٤,٠	٤,٩	٤,٥	٤,٦	٤,٤	

مصادر متنوعة في مجال الهندسة الوراثية

تمثل القائمة التالية نخبة مختارة من المراجع المتنوعة في شتى مجالات الهندسة الوراثية

المرجع	الموضوع
Chilton (١٩٨٠)	استخدامات الـ Ti-plasmids في مجال الهندسة الوراثية
McDaniel (١٩٨١)	الدراسات المبكرة في مجال الهندسة الوراثية
Panopoulos (١٩٨١)	الدراسات المبكرة في مجال الهندسة الوراثية
Rachie & Lyman (١٩٨١)	الدراسات المبكرة في مجال الهندسة الوراثية
Flavell (١٩٨٢)	طرق التعرف على الجينات وفصلها لأغراض الهندسة الوراثية
Schell (١٩٨٢)	استخدامات الـ Ti-plasmids في مجال الهندسة الوراثية
Schroder وآخرون (١٩٨٣)	استخدامات الـ Ti-plasmids في مجال الهندسة الوراثية
Hull (١٩٨٣)	استخدامات الفيروسات في مجال الهندسة الوراثية
Mantell وآخرون (١٩٨٥)	مقدمة في الهندسة الوراثية النباتية
Dodds (١٩٨٥)	الهندسة الوراثية للنباتات
Brown (١٩٨٦)	مقدمة في الهندسة الوراثية
Lycett & Grierson (١٩٩٠)	الهندسة الوراثية لمختلف الأغراض
Nelson وآخرون (١٩٩٠)	التحويل الوراثي لمقاومة الفيروسات بجين غلافها البروتيني
Hilder وآخرون (١٩٩٠)	التحويل الوراثي لمقاومة الحشرات باستعمال جينات ذات أصل نباتي
Ryan (١٩٩٠)	التحول الوراثي لمقاومة الحشرات ومسببات الأمراض بجينات مثبطات إنزيمات البروتييز
Beachy وآخرون (١٩٩٠)	التحول الوراثي لمقاومة الفيروسات بجينات الغلاف البروتيني
Webb & Wilson (١٩٩١)	إنزيمات القطع واستعمالها في تحضير خرائط الدنا
Franks & Birch (١٩٩١)	التحول الوراثي بتقنيات القذف الدقيق للجينات.
Grant وآخرون (١٩٩١)	التعديل الوراثي باستعمال الأجروباكتيريم
Rathus & Birch (١٩٩١)	التعديل الوراثي عن طريق التثقيب الكهربائي للأغشية الخلوية
Gatehouse وآخرون (١٩٩٢)	الهندسة الوراثية لوقاية النباتات
Mullineaux (١٩٩٢)	الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش
Peferoen (١٩٩٢)	الهندسة الوراثية لمقاومة الحشرات باستعمال الجين Bt
Reavy & Mayo (١٩٩٢)	الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

المرجع	الموضوع
Flavell (١٩٩٢)	أهمية النبات "الموديل" *A. thaliana* لمربى النبات
Gressel (١٩٩٣)	التحول الوراثى لتحمل مبيدات الحشائش
Fitchen & Beachy (١٩٩٣)	الهندسة الوراثية لقاومة الفيروسات
Gatehouse وآخرون (١٩٩٣)	الهندسة الوراثية لقاومة الحشرات
Broglie & Broglie (١٩٩٣)	استخدام جين الشيتينيز chitinase فى تحويل النباتات وراثيًّا لقاومة الفطريات
Scholthof وآخرون (١٩٩٣)	الهندسة الوراثية لقاومة الفيروسات
Dale وآخرون (١٩٩٣)	الإنتاج التجريبى والتجارى للمحاصيل المحولة وراثيًّا
Nakata & Okita (١٩٩٤)	التحويل الوراثى لتحفيز إنتاج النشا فى درنات البطاطس
Sowokinos (١٩٩٤)	تنظيم تراكم السكروز فى البطاطس – أثناء التخزين – بالهندسة الوراثية
Tu وآخرون (١٩٩٤)	التعبير عن بروتين الكاشو الغنى بالمثيونين فى درنات البطاطس.
Nicholl (١٩٩٤)	الهندسة الوراثية
Grierson & Fray (١٩٩٤)	التحكم فى النضج فى الطماطم المحولة وراثيًّا
Lomonossoff (١٩٩٥)	الهندسة الوراثية لقاومة الفيروسات
Grumet (١٩٩٥)	الهندسة الوراثية لقاومة الفيروسات
Picton وآخرون (١٩٩٥)	الهندسة الوراثية للطماطم بهدف إبطاء التقدم فى نضج الثمار
Kavanagh & Spillane (١٩٩٥)	الهندسة الوراثية لقاومة الفيروسات
Jahne وآخرون (١٩٩٥)	الهندسة الوراثية لمحاصيل الحبوب الصغيرة
Nascari & Montanelli (١٩٩٧)	الهندسة الوراثية لقاومة الأمراض
Carozzi & Koziel (١٩٩٧)	الهندسة الوراثية لقاومة الحشرات
Peferoen (١٩٩٧)	الهندسة الوراثية لقاومة الحشرات بالبروتينات البللورية للبكتيريا *Bacillus thuringiensis*
Czapla (١٩٩٧)	التحول الوراثى لقاومة الحشرات باللكتينات lectins
Chrispeels (١٩٩٧)	التحول الوراثى للبقوليات لقاومة الـ bruchid بواسطة جين مثبط الأميليز من الفاصوليا
Reeck وآخرون (١٩٩٧)	التحول الوراثى لقاومة الحشرات بجينات مثبطات البروتينيز
Chilton (١٩٩٧)	التحول الوراثى لقاومة الحشرات بجينات مركبات الأيض الثانوية

المرجع	الموضوع
Kramer (١٩٩٧)	التحول الوراثى لمقاومة الحشرات بجينات الشيتنيز
Roush (١٩٩٧)	كسر الحشرات للمقاومة الحشرية فى النباتات المحولة وراثيًا
Rajesh & Luthra وآخرون (١٩٩٧)	حصر كامل لجميع دراسات التحول الوراثى التى أجريت حتى نهاية عام ١٩٩٥ باستعمال تقنية القذف الدقيق microprojectile technology بالجينات المرغوب فيها
Hedden وآخرون (١٩٩٨)	التحويل الوراثى المؤثر فى الشكل المظهرى بالتحكم فى تمثيل الجبريللين
Amer. Soc. Hort. Sci. (١٩٩٨)	تأثير التكنولوجيا الحيوية على البيئة – ندوة علمية
Herbers & Sonnewald (١٩٩٨)	النباتات المحولة وراثيًا. الأساس الكيميائى الحيوى والفسيولوجى لما يحدث فيها
Altman (١٩٩٨)	مرجع فى التكنولوجيا الحيوية الزراعية، وخاصة الهندسة الوراثية
Potrykus وآخرون (١٩٩٨)	الهندسة الوراثية للمحاصيل الزراعية
Topfer & Martini (١٩٩٨)	هندسة المحاصيل الزراعية فى نوعية المحتوى الغذائى من البروتينات والمواد الكربوهيدراتية والدهون
Pueyo & Hiatt (١٩٩٨)	إنتاج المركبات الدوائية فى النباتات المهندسة وراثيًا
Koziel وآخرون (١٩٩٨)	الهندسة الوراثية لمقاومة الآفات الحشريه
Gressel (١٩٩٨)	الهندسة الوراثية لمقاومة مبيدات الحشائش
Chopra وآخرون (١٩٩٩)	تطبيقات الهندسة الوراثية النباتية
Mandaokar وآخرون (١٩٩٩)	التحول الوراثى بالجين Bt
Gatehouse (١٩٩٩)	الهندسة الوراثية لمقاومة الحشرات
Jannson & Maenpaa (١٩٩٩)	التحول الوراثى بطريقة القذف المدفعى الدقيق للجينات
Bent & Yu (١٩٩٩)	تطبيقات الهندسة الوراثية فى مجال مقاومة الأمراض والحشرات
Chawla (٢٠٠٠)	الهندسة الوراثية النباتية وتطبيقاتها
Kempken (٢٠٠١)	استعراض للتقدمات فى مجال الهندسة الوراثية
Weber وآخرون (٢٠٠١)	تعديل الزيوت النباتية بالهندسة الوراثية
Santaniello وآخرون (٢٠٠٢)	وضع ومستقبل تسويق الأغذية المعدلة وراثيًا عاليًا
Tepfer (٢٠٠٢)	تقييم مخاطر زراعة النباتات المهندسة وراثيًا لمقاومة الفيروسات

المرجع	الموضوع
Oksman-Caldentey & Barz (٢٠٠٢)	التكنولوجيا الحيوية النباتية والهندسة الوراثية
Schulman (٢٠٠٢)	الهندسة الوراثية لتحوير النشا والمواد الكربوهيدراتية الأخرى
Shewry (٢٠٠٢)	الهندسة الوراثية لتحسين المحتوى البروتينى للبذور ونوعيته
Coughlan & Kinney (٢٠٠٢)	الهندسة الوراثية للنباتات كمصدر للزيوت المحورة
Jeske (٢٠٠٢)	الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات
Tenhaken (٢٠٠٢)	الهندسة الوراثية لمقاومة البكتيريا والفطريات
Llewellyn & Higgins (٢٠٠٢)	الهندسة الوراثية لمقاومة الحشرات
Gressel (٢٠٠٢)	الهندسة الوراثية لمقاومة مبيدات الحشائش
Slater وآخرون (٢٠٠٣)	الهندسة الوراثية: الأساسيات والتطبيقات
Jacobs وآخرون (٢٠٠٢)	الهندسة الوراثية لتحسين القيمة الغذائية
Atkinson وآخرون (٢٠٠٣)	الهندسة الوراثية لمقاومة النيماتودا
Richards وآخرون (٢٠٠٥)	حجج المعترضون على الهندسة الوراثية النباتية والرد عليها
Gray وآخرون (٢٠٠٥)	تصميم واستعمال قاذفة جينات لأغراض الهندسة الوراثية



الفصل الحادى عشر

الهندسة الوراثية: الأسس العلمية وتقنيات الدنا

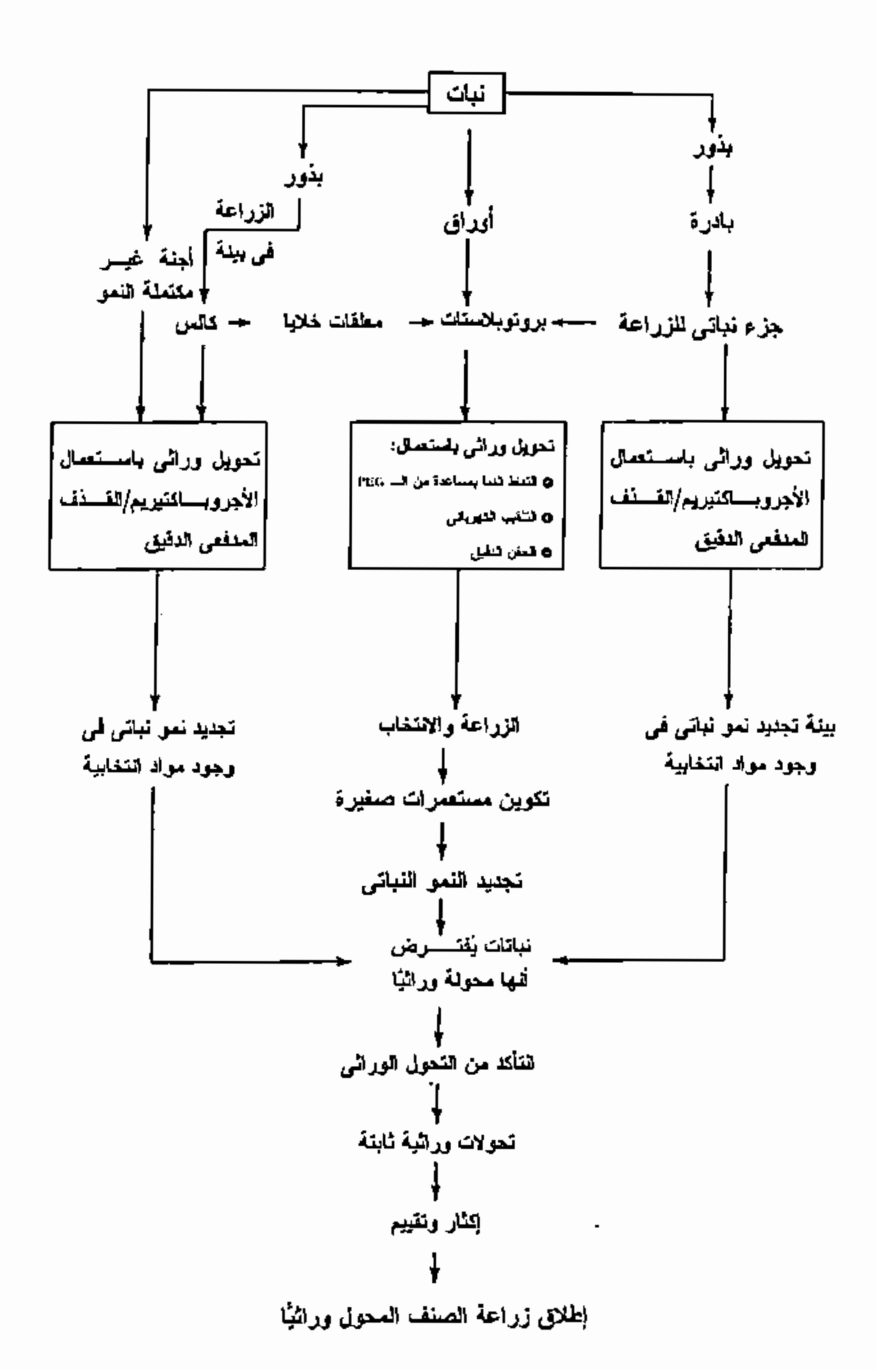
تمهيد

ينصبُّ اهتمامنا فى هذا الفصل والفصل التالى (الثانى عشر) على كيفية تداول الجينات gene manipulation لأغراض الهندسة الوراثية. ومن التعريفات الدقيقة لهذه العملية (تقنيات تداول الجينات gene manipulation) أنها تكوين توافقات جديدة من المادة الوراثية بإيلاج جزيئات حامض نووى - أنتج بأى طريقة خارج الخلية - فى أى فيرس، أو بلازميد بكتيرى، أو أى ناقل آخر؛ بما يسمح بدمجه فى جينوم عائل لا يحتوى على تلك الجزيئات بصورة طبيعية، ولكنها تكون قادرة على التكاثر المستمر مع جينوم العائل بعد دمجها فيه (عن Chawla ٢٠٠٠). هذا .. إلاّ أننا نقصر اهتمامنا فى هذا الفصل على عملية عزل المادة الوراثية - المتمثلة فى تتابعات نيكليوتيدية معينة - وتضخيمها (لأجل استعمالها فى عمليات التحول الوراثى)، وهو ما أصبح يعرف باسم gene cloning.

هذا .. ويلخص شكل (١١-١) المخطط العام لاستراتيجيات عمليات التحول الوراثى لأجل إنتاج النباتات المحولة وراثيًا.

عزل وإكثار الجينات Gene Cloning: المبادئ العامة

يعرف المصطلح gene cloning بأنه عملية عزل وإكثار أو تضخيم أو مضاعفة التتابعات النيكليويدية لجين ما بإيلاج تلك التتابعات فى خلية بكتيرية، حيث "يتكاثر" معها. وعند زراعة cloning جزء من الدنا فإن ذلك يسمح بإنتاج كميات غير محدودة من ذلك الجزء.



شكل (١١-١): مخطط عام لعمليات التحول الوراثى لأجل إنتاج النباتات المحولة وراثيًا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

وتتضمن تقنيات زراعة الجينات تكوين جزيئات دنا جديدة تمامًا عن طريق وصل تتابعات دنا من مصادر مختلفة، ويطلق على الدنا المنتج بتلك الطريقة - غالبا - اسم الدنا المعاد تركيبه recombinant DNA. كذلك يطلق على عملية تكوين الدنا بتلك الكيفية اسم الهندسة الوراثية، أو معالجة الجين gene manipulation.

الدنا كمصدر للتتابعات النيكليوتويدية

لا يكون الجين مجرد سلسلة متتابعة من النيكلوتيدات التي تشكل الشفرة الخاصة ببروتين معين، ولكن ذلك التسلسل يعترضه غالبًا تتابعات عديدة من النيكلوتيدات لا تشفر لهذا البروتين، ولا تظهر في الرنا الرسول mRNA، الذي يفترض أنه يمثل نسخة مقابلة لتتابعات الدنا في الجين. تعرف تلك الظاهرة باسم split gene، وهي تصف وجود نوعين من تتابعات النيوكليوتيدات التي تنتشر على امتداد كل جين، يطلق على أحدهما اسم exons، وهو يُمثل التتابعات التي تستنسخ في صورة mRNA، وعلى الجزء الآخر اسم introns، وهو يمثل التتابعات التي لا تستنسخ. وجدير بالذكر أن هذا الجزء - الـ introns - يكثر وجوده بشدة في النبات والحيوان، ولا يعرف دوره الحقيقي إلى الآن

وبذا . فإن الرنا الرسول لا يمثل نسخة كاملة من تتابعات النيكلوتيدات في الجين، ولكنه يمثل ذلك الجزء من الجين الذي يشفر لتتابعات الأحماض الأمينية في البروتين الناتج، بالإضافة إلى تتابعات إضافية من النيكلوتيدات تمثل كل طرف من الجزء الجيني الخاص بالشفرة الوراثية. وتعرف بعض تتابعات النيكلوتيدات التي تسبق الشفرة الوراثية باسم promoter region، وهي التي تحدد متى يكون التعديل الجيني، وأين يحدث، وبأي معدل يكون. تتفاعل تتابعات النيكلوتيدات في الـ promoter region ببروتينات خاصة لتنظيم الحالة التي يكون عليها نشاط الجين. ويعرف نوعان من هذه الـ promoters، هما: الـ constitutive، والـ inducible. ويفيد النوع الأول (الـ constitutive) في جعل الجين قادر على التعبير طول الوقت. وترتبط تلك الـ constitutive regions بما يعرف بإنزيمات الـ house keeping التي تلزم - على الدوام - للعمليات التي لا غنى عنها بالكائنات الحية، مثل الأيض وإنتاج الطاقة. وبديهي أن هذه الـ promoters تختص بالجينات التي تعبر عن ذاتها في كل خلايا الكائن أو في

أنسجة أو خلايا معينة فقط، مثل جينات البروتينات التي تخزن بالبذور أما الـ inducible promoters فإنها تجعل الجينات نشطة فقط تحت تأثير بعض المحفزات الخاصة للـ promoter. ويرجع إلى هذا النوع من الـ promoters خاصية تعبير بعض الجينات عن ذاتها في مراحل معينة فقط من تطور الكائن، أو عند الاستجابة لهرمونات نباتية معينة. كما تُستحث بعض الجينات إلى التعبير عن ذاتها استجابة لمركبات كيميائية معينة، مثل الجينات الخاصة بالتفاعل بين الكائن الحي والمسببات المرضية (Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الرنا كمصدر للتتابعات النيكليوتويدية

عند التعامل مع الكائنات الـ eukaryotic مثل النباتات، فإن أول الأمور التي يجب حسمها قبل الشروع في عزل جين ما (gene cloning) هو ما إذا كان من الأفضل البدء بالرنا الرسول (mRNA)، أم بالدنا الجينومي. وعلى الرغم من أن الدنا يمثل - كما أسلفنا - الجينوم الكامل للكائن، فإنه قد يحتوي على دنا لا يشفر (non-coding DNA)، مثل الـ introns، ومناطق التحكم control regions، والتتابعات المتكررة، الأمر الذي قد يسبب - أحيانًا - مشاكل، وخاصة إذا ما كان الجينوم كبيرا. هذا إلاّ أنه إذا كان المطلوب هو التحكم في التعبير الجيني، فإنه سيكون من الضروري عزل التتابعات المتحكمة في ذلك التعبير، وبذا لا يكون هناك مفر من حتمية التعامل مع الدنا الجينومي

وفي المقابل .. فإن الرنا الرسول Messenger RNA يتميز على الدنا - كمصدر للنيكليوتيدات، بما يلي:

١ - يمثل الرنا الرسول المعلومات الوراثية المعبر عنها بالفعل بواسطة الخلايا المستعملة في التحضير، الأمر الذي يمكن أن يشكل وسيلة انتخابية أولية قوية، نظرا لعدم تمثيل كل الدنا الجينومي في عشيرة الرنا الرسول

٢ - إن كان الجين المرغوب فيه مُعَبّرًا عنه بشكل جيد، فإن ذلك قد يترتب عليه وفرة في الرنا الرسول الخاص بهذا الجين، مما قد يجعل عملية عزل الجين أكثر سهولة

٣ – نظرًا لأن الرنا الرسول لا يمثل سوى تتابعات الجين التى يُشفر لها؛ فإن جميع الـ introns تكون مستعدة – تلقائيًّا – أثناء تكوين الرنا. وبذا .. فإن عملية إنتاج البروتين الناتج من عملية الهندسة الوراثية تكون دقيقة وعلى نحو مستقيم إذا ما استخدم الرنا الرسول فى التحويل الوراثى.

التخليق المعملى كمصدر للنيكليوتويدات

على الرغم من أن الدنا الجينومى والرنا الرسول هما المصدران الرئيسيان لجزيئات الأحماض النووية التى يُراد عزلها وإكثارها، فإن من الممكن تخليق الدنا معمليًّا إذا ما عرف ترتيب الأحماض الأمينية الخاصة بالبروتين. وبينما تعد تلك الطريقة شديدة الصعوبة بالنسبة لأجزاء الدنا الطويلة، فإنها تفيد فى بعض الحالات، وخاصة إذا ما رغب فى تخليق أجزاء قصيرة من الجين لاستكمال التتابعات قبل عزل الجين وإكثاره (عن Nicholl وآخرين ١٩٩٤).

خطوات الـ gene cloning

تتكون الأحداث الأساسية لعملية الـ gene cloning من الخطوات التالية:

١ – عزل الجين المرغوب فيه.

٢ – دمج الدنا المرغوب فيه فى جزئ دنا صغير قادر على الانقسام (يكون عادة حلقى الشكل) يطلق عليه اسم الناقل vector. يمكن أن يكون هذا الناقل بلازميد البكتيريا *E. coli*، أو فيرس، أو كوزميد cosmid ... إلخ. ويطلق على الناقل الذى أدمج فيه الجين المعنى اسم الناقل المعاد تركيبه recombinant vector.

٣ – يتم إدخال الناقل المعاد تركيبه فى عائل مناسب بعملية تحول وراثى transformation.

٤ – انتخاب خلايا العائل التى حصلت على جزيئات الدنا المعاد تركيبها recombinant DNA molecule.

٥ – إكثار جزيئات الدنا المعاد تركيبها داخل خلايا العائل لإنتاج عدد من النسخ المتماثلة للجين المزروع.

وفى عملية زراعة الجينات تجب إزالة جزء الدنا الذى يشفر لتمثيل ناتج الجين المرغوب فيه من الكائن العائل ونقله إلى الناقل (البلازميد، أو الفيرس البكتيرى phage أو الكوزميد) لتكوين جزئ دنا جديد recombinant DNA molecule، ويعنى ذلك قطع جزئ الدنا فى مواقع محددة ووصلهم معًا بطريقة متحكم فيها

هذا .. ويتطلب إنجاز عملية التحول الوراثى فهم ودراسة كيفية تداول وإجراء أربعة أمور أساسية هى كما يلى:

١ – وسائل زراعة الجينات cloning vehicles، أى النواقل vectors

٢ – الإنزيمات التى تقوم بقطع جزيئات الدنا من الكائنات الحاملة لها، وتلك التى تقوم بلصقها فى جزيئات النواقل.

٣ – جزيئات الدنا أو مكتبات الجينات gene libraries.

٤ – انتخاب سلالة من الخلايا المحولة وراثيًا، أى من تلك التى تلقت الدنا المركب (عن Chawla ٢٠٠٠).

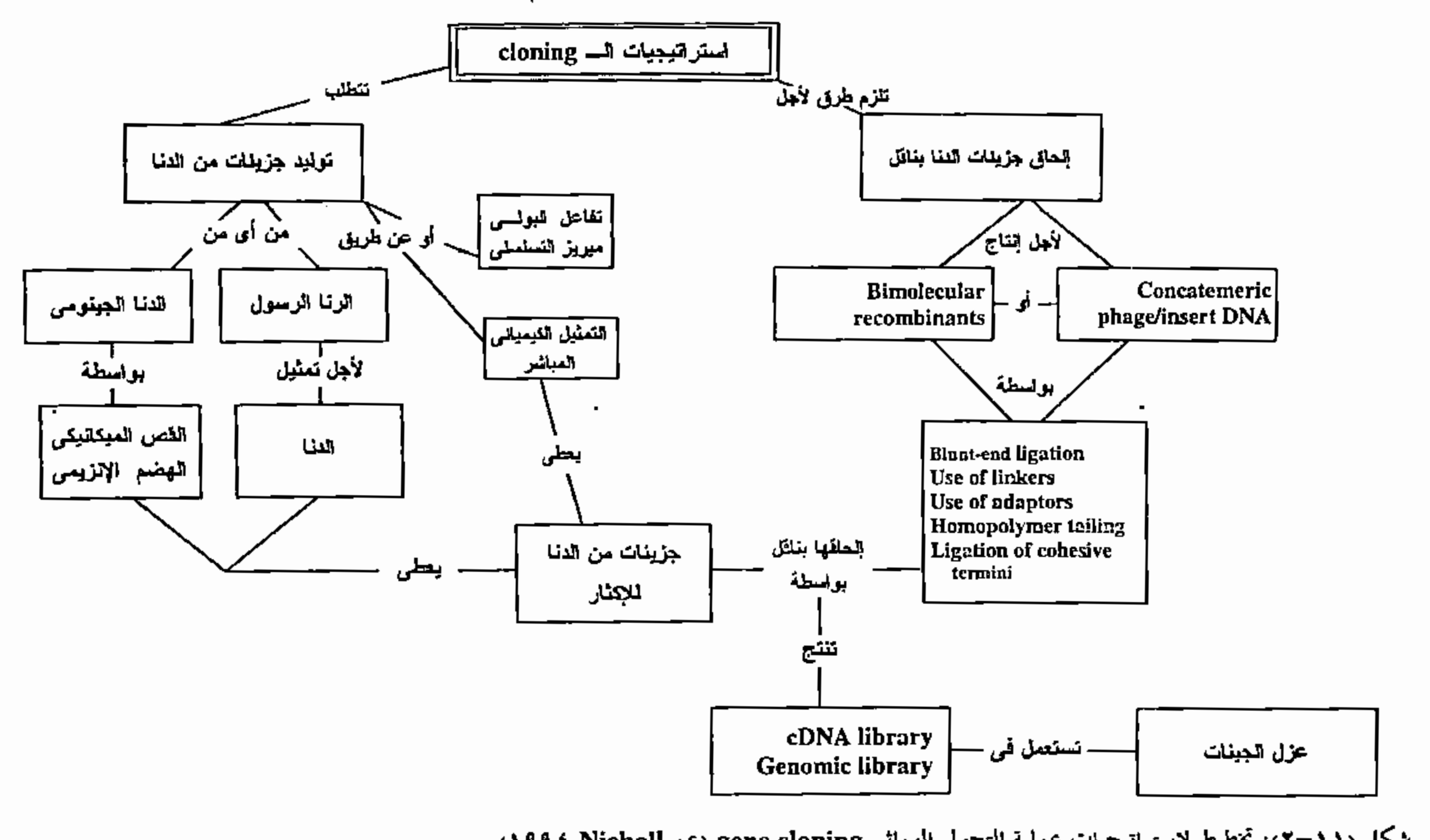
هذا .. ويلخص شكل (١١–٢) استراتيجيات عملية الـ gene cloning.

عزل وإكثار الجينات Gene Cloning: الوسائل والتقنيات

تمهيد

إن الهدف الرئيسى من إكثار الجينات ومضاعفة أعدادها هو عزل وتوصيف الجينات لأجل استعمالها فى البحوث البحتة والتطبيقية، وخاصة لأغراض الهندسة الوراثية.

لقد بدأت عملية إكثار الجينات ومضاعفة أعداد النسخ الخاصة بها (gene cloning) باكتشاف الإنزيم reverse transcriptase فى الفيروسات. يقوم الرنا الفيروسى بتحضير الدنا من قالب template الرنا بمساعدة ذلك الإنزيم، الذى يستعمل الآن فى تحضير الدنا المقابل (المكمل) complementary DNA باستعمال الرنا الرسول mRNA كقالب template



شكل (١١-٢): تخطيط لاستراتيجيات عملية التحول الوراثى gene cloning (عن Nicholl ١٩٩٤).

كذلك تجرى عملية إكثار الجينات ومضاعفة أعدادها من خلال تقنية الـ polymerase chain reaction (اختصارًا: PCR)، حيث تُنتج نسخ عديدة من شريط الدنا المطلوب مضاعفته صناعيًا

بعد أن يتم تركيب أو إنشاء دنا جديد recombinant DNA فى المختبر، فإنه يتعين عزل التتابعات المرغوب فيها، الأمر الذى يتحقق بثلاثة أمور:

١ – فصل الجزيئات الجديدة عن بعضها البعض

٢ – إكثار وتكرار (amplification) التراكيب الجديدة لكى يتوفر قدر كافٍ منها للعمليات التالية

٣ – انتخاب جزء الدنا موضوع الاهتمام.

وتمثل الخطوتان الأولى والثانية أعلاه – ما يعرف باسم الـ gene cloning. ويتطلب إجراء هاتين الخطوتين استعمال حامل مناسب لجزيئات الدنا (vector) وكائن عائل آخر مناسب لإكثاره (host)

تتباين العوائل المناسبة لعملية إكثار الدنا، ومن أنواعها:

١ – البكتيريا (عائل prokaryotic)، مثل *Escherichia coli*، و *Bacillus subtilis*، و *Streptomyces* spp.

٢ – الفطريات (عائل eukaryotic)، مثل الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*، و *Aspergillus nidulans*.

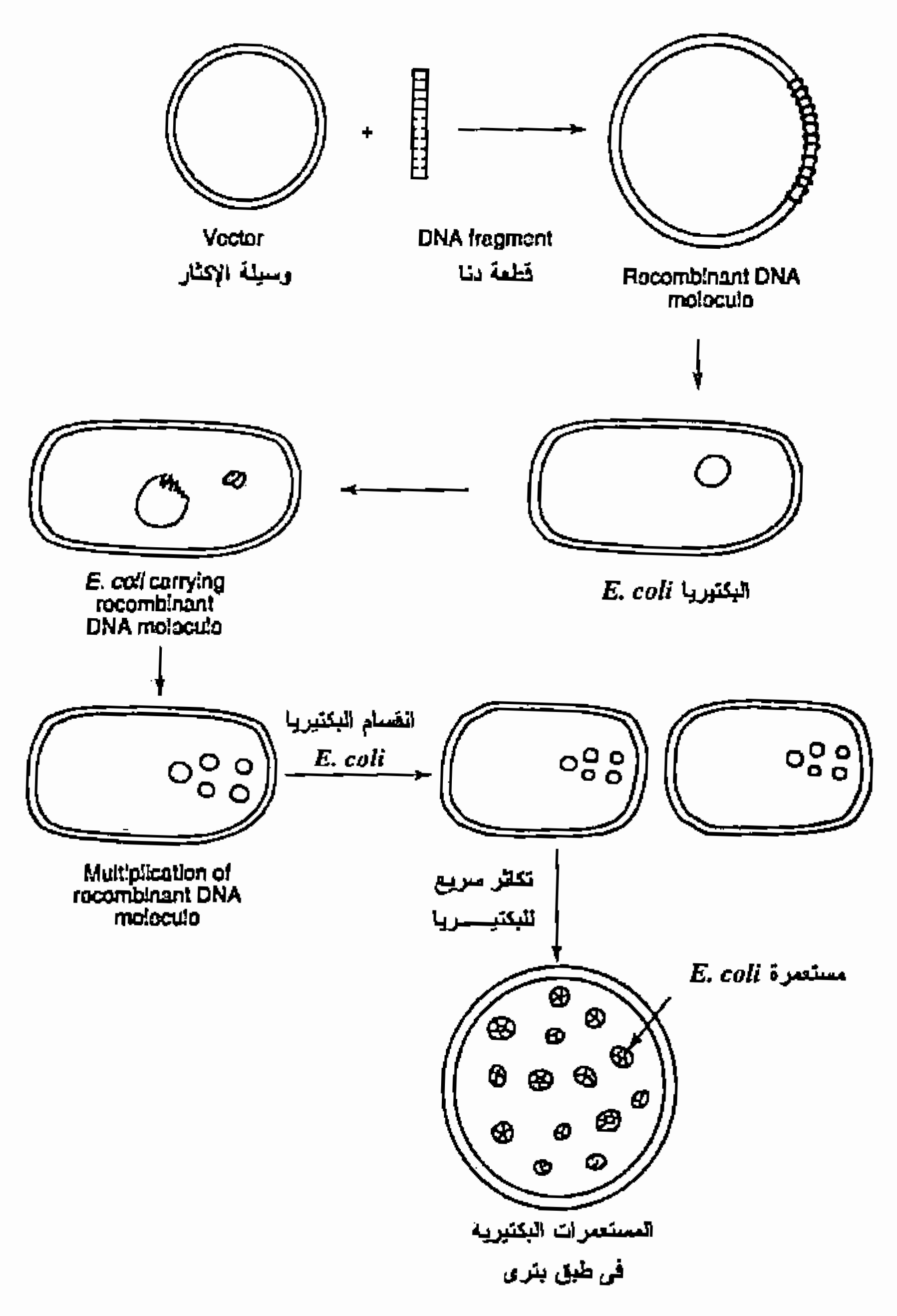
٣ – النباتات (عائل eukaryotic)، وقد تستعمل منها البروتوبلاستات، أو الخلايا أو النباتات الكاملة.

٤ – الحيوانات (عائل eukaryotic)، وهى قد تكون خلايا حشرية (مثل ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster*)، وخلايا الثدييات، والـ oocytes، والكائنات الكاملة (Nicholl ١٩٩٤).

ويتضمن إكثار الجينات ومضاعفة أعدادها (gene cloning) أربع خطوات، كما يلى (شكل ١١-٣):

١ – تحديد قطعة الدنا التى يُرغب فى إكثارها وعزلها، وقطعها إلى أجزاء صغيرة،

ثم دمجها فى vector مناسب (فيرس أو بلازميد أو كوزميد) لإنتاج دنا محول وراثيًا recombinant DNA molecule.



شكل (١١-٣): خطوات الـ **gene cloning**.

٢ – حقن الدنا المحول وراثيًا فى عائل مناسب أو خلية (هى غالبًا *E. coli*).

٣ – إكثار الدنا المحول وراثيًا داخل خلية العائل ونقله – كذلك – إلى خلايا نسل العائل

٤ – يؤدى الانقسام المستمر للعائل إلى إنتاج سلالات clones تتكون من خلايا متطابقة تحتوى على نسخ من الدنا المحول وراثيًا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

التعرف على الجينات وعزلها وفصلها وتحديد تتابعاتها

إن التعرف على الجينات وعزلها ودراسة تتابعاتها من النيكليوتيدات يتطلب تحليلاً مفصلاً للدنا، وهو الأمر الذى أصبح ممكنًا من خلال نشاط مجموعة واسعة من الإنزيمات الميكروبية، من أهمها ما تعرف باسم type II restriction endonucleases، والـ reverse transcriptase.

تقوم الـ restriction enzymes بقطع خيط النا المزدوج عند مواقع محددة إلى أجزاء لا يزيد طول كل منها عن ٤–٨ نيكليوتيدات متتابعة تعد خاصة بكل إنزيم. تستعمل هذه الإنزيمات فى تقطيع أوصال الدنا إلى أجزاء صغيرة عديدة جدًا، ويمكن تعليم كل الدنا بـ restriction sites خاصة على صورة restriction maps

تتواجد الـ reverse transcriptase فى الفيروسات التى تتكون فيها المادة الوراثية من الرنا تستعمل هذه الفيروسات تلك الإنزيمات لإنتاج خيط دنا مقابل للرنا فى البكتيريا العائل. وتستخدم تلك الإنزيمات فى دراسات التكنولوجيا الحيوية لتحضير نسخ من الدنا مقابلة للرنا الرسول لإنتاج نسخ عديدة من الجين.

المجسات

يستخدم المصطلح probe – بمعنى مجس – فى علم البيولوجيا الجزيئية – للإشارة إلى تتابع صغير من النيكليوتيدات فى الدنا أو الرنا يستعمل فى تحديد أجزاء الأحماض النووية التى تحتوى على تتابعات نيكليوتيدية متممة أو مقابلة لرنا أو دنا

يُراد معرفته وهى تستخدم فى عمل الخرائط الجزيئية، وتحديد الجينات وعزلها، أو التعرف على تتابعات معينة لاستخدامها فى دراسات الهندسة الوراثية، والتأكد من نقل الجينات إلى النباتات المحولة وراثيًا، والـ DNA fingerprinting لأجل تعريف الأصناف. كما تستخدم المجسات كذلك فى اختبار تواجد مسببات الأمراض فى النباتات والحيوانات والإنسان

الفصل الكهربائى لأجزاء الدنا المقطعة

يجرى تحليل الأحماض النووية بقطعها إلى أجزاء صغيرة من خلال نشاط الـ restriction enzymes، ثم توضع تلك الأجزاء المقطعة فى أحد أطراف طبق زجاجى أو بلاستيكى توجد به طبقة رقيقة من الأجاروز agarose أو البولى أكريلاميد polyacrylamide المصلب وبعد إضافة محلول منظم مناسب إلى الطبق . يمرر فيه تيار كهربائى ذات فولت عالٍ (٦٠-١٠٠ فولت) خلال الجل وتبعا لشحنتها السالبة، فإن الأحماض النووية تتحرك من الكاثود (القطب السالب) إلى الآنود (القطب الموجب) على الجل بسرعة تتوقف على حجم جزء الحامض النووى، حيث تستقر أقصر الأجزاء فى أقصى نهاية الجل ويتم التعرف على الأجزاء التى تستقر فى مواضع مختلفة من الجل بالـ radio labelled probe hybridization (أى تُزاوج بمجسات مناسبة لها معلمه إشعاعيًا)، ثم تعرض لفيلم أشعة إكس. ويمكن تقدير أحجام أجزاء الدنا بمقارنة هجرة الأحزمة bands التى استقرت فيها بأجزاء أخرى قياسية فصلت على نفس الجل

وقد استخدمت خاصية قدرة خيوط الأحماض النووية المكملة لبعضها البعض للارتباط معا بواسطة E. M. Southern فى تحليل أجزاء الأحماض النووية (أجزاء الدنا) بالتهجين بين خيوط الدنا (DNA-DNA hybridization) بالطريقة التى عرفت باسم Southern blotting وفيها تُخلط أجزاء الدنا ثم تنقل (تطبع) من الجل إلى مهاد ترشيح من النيلون (plotted) يصبح الدنا المنتشر على المرشح ثابتا إذا رفعت حرارته إلى ٨٠ْم. يلى ذلك إضافة مجس من خيط مفرد معلم إشعاعيًا، فإذا تهجن معه كان ذلك دليلاً على أن أجزاء الدنا تحمل التتابعات المقابلة لتتابعات المجس يتم غسل المجس الزائد حيث يمكن تعليم الجزء الذى يوجد به تزاوج على المرشح على فيلم أشعة إكس.

وقد استخدم المبدأ ذاته للكشف عن التتابعات في الـ mRNA الذى يفصل إلى أجـزاء بواسطة الفصل الكهربائى electrophoresis ثـم يطبـع علـى مرشـح، فيمـا يعـرف باسـم Northern plots كذلك يمكن تحليل البروتينـات، حيـث تنتقـل البروتينـات بـدلا مـن الأحماض النووية من الجل إلى حامل مثبت لهـا فيمـا يعـرف باسـم Western plotting ويتم التعرف على البروتينات فى الـ blots باستعمال الأجسـام المضـادة كمجسـات (عـن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

إكثار الجينات وأجزاء الأحماض النووية عن طريق الـ Vectors

يتطلب توصيف وتحوير ونقل الجين – أو أى جزء من الدنا – إكثاره بأعداد كـبيرة، فيما يعرف باسم cloning تكون كل نسخ الدنا المكثر متماثلة تمامًا مثـل أفـراد السـلالة الخضرية التى تكثر بطرق لاجنسية.

ويتحقق إكثار أى أجزاء من الدنا بإدماجها ضمن دنا آخر ينقسـم ذاتيًّا يطلـق عليـه اسم vector، ويكون عـادة بلازميـد بكـتيرى bacterial plasmid، أو فـيرس، أو تكـوين مركب من كليهما وواقـع الأمـر أن الـ vector عبـارة عـن قطعـة دنـا ذات قـدرة علـى الانقسام فى عائل مناسب توضع أجزاء الدنا التى يُراد إكثارها فى vectors تعرف باسم chimeric vectors، وهى التى تحقن – بالتالى – فى عائل مناسب مثل البكتيريا، حيث تنقسم تلقائيًّا إلى نسخ عديدة وتعرف تلك العملية من بداية تضمين قطعة الدنا التى يُراد إكثارها فى الـ vector حتى حدوث الانقسام باسـم recombinant gene technology. أو إكثار الجينات gene cloning، كما تسـمى – كذلك – باسـم الهندسـة الوراثيـة genetic engineering

ومن أهم صفات الـ vector الجيـد أن يكـون مـن السـهل عزلـه وحقنـه فـى خلايـا العائل، وأن يتكاثر تلقائيًّا، وأن يحتوى على مواقع خاصـة لعديـد مـن الـ restriction enzymes، بحيـث يمكـن إدمـاج قطـع الـدنا فيـه دونمـا الإضـرار بـأى عمليـة حيويـة ضرورية، وأن يحتوى على مُعَلِّم مناسب ليسهل التعرف على خلايا العائل (التى حقنت بالـ vector) التى تحولت وراثيًّا. وقد تطورت أجزاء الدنا التى استعملت كـ vector صع

أنواع العوائل الطبيعية، بحيث أن اختيار الـ vector يعتمد على النوع العائل الذى يُرغب فى إكثار الجين فيه، ولا تحتوى تلك الـ vectors الطبيعية على كل الخصائص المطلوبة فى الـ vectors.

البلازميدات البكتيرية

إن البلازميدات البكتيرية bacterial plasmids عبارة عن جزيئات مزدوجة حلقية تنقسم ذاتيًا، وتوجد فى الخلايا كوحدات خارج النواة. يمكن لهذه البلازميدات أن تنقسم بالمعدل ذاته الذى تنقسم به الخلايا البكتيرية، ويتم الحفاظ عليها كبلازميدة واحدة أو عدد قليل منها بكل خلية. وتنقسم النسخ العديدة من البلازميدات - من ناحية أخرى - بمعدل مستقل عن معدل انقسام الخلية العائل إلى درجة إمكان تواجد أكثر من ١٠٠٠ نسخة من البلازميد بكل خلية ويفيد التركيب الحلقى للبلازميدات فى تفككها عند نقطة واحدة، وهى التى يمكن عندها إدماج قطعة الدنا الغريبة فيها، حيث تلتئم النهايات المقطوعة من الدنا الحلقى مع نهايتى الدنا الغريب؛ لإنتاج حلقة أكبر حجمًا يمكن فصلها بسهولة عن البلازميد الأصلى غير المحول وراثيًا. تعرف أى قطعة من الدنا يُراد إكثارها باسم DNA insert، وهى تزرع أولاً فى بلازميدة للحصول على vector كيميرى chimeric vector أو recombinant DNA، الذى يحقن بدوره فى العائل (*E. coli*). وتحتوى معظم الـ plasmid vectors على جينات تكسبها مقاومة لبعض المضادات الحيوية، مثل الامبسيلين ampicillin والتتراسيكلين tetracycline، والكلورمفينيكول chloramphenicol، بما يسمح بسهولة التعرف على الخلايا البكتيرية التى تحتوى على تلك الـ vectors لأن الخلايا الأخرى تقتل بفعل المضادات الحيوية.

البكتيروفاجات

إن الفيروسات التى تهاجم البكتيريا (البكتيريوفاجات bacteriophages) يمكن استعمالها كـ vectors لأنها يمكن أن تدمج فى الكروموسوم البكتيرى وتتكاثر. وأكثر البكتيروفاجات شيوعًا نوعان، هما: lambda (λ)، و M_{13} وبالمقارنة بالبلازميدات البكتيرية، فإن البلازميدات الفيروسية phage vectors يمكن التعرف عليها بسهولة

لأنها تكوّن مناطق خالية من النمو البكتيرى فى أطباق بترى المحقونة بالبكتيريا، وتعرف تلك المناطق باسم plaques وتعد البلازميدات الفيروسية أكثر كفاءة فى إكثار قطع الدنا الكبيرة، وتحقق تحولاً وراثيًا أكثر كفاءة لـ *E. coli*.

ك) Cosmid vectors

إن الـ cosmid vectors عبارة عن جزيئات بلازميد محورة تحتوى على جزء معين من البكتيروفاج، متضمنًا تلك التى تعرف بالـ cos region ومثل البكتيروفاجات . فإن الكوزميدات يمكنها حمل قطع دنا كبيرة، ولها القدرة على التكاثر الذاتى مثل البلازميدات ويساعد تواجد مواقع الـ cos فى تسهيل دمج الدنا فى رؤوس الفاج. وتعد الكوزميدات عالية الكفاءة فى إكثار الدنا (cloning)، ولكنها لا تتسع لأكثر من ٤٠–٥٠ kbp من الدنا. ونظرًا لاحتواء الكوزميدات على معلمات خاصة من البلازميدات فإن التعرف على الـ vector المحول وراثيًا يكون بنفس الطريقة المستعملة مع البلازميد الأصلى

ل) Phagemids

يطلق اسم phagemids على vectors مركبة صناعيًا بالجمع بين الصفات المرغوب فيها من كل من البلازميدات والبكتيروفاجات الخيطية filamentos bacteriophages إن البلازميدات تتضمن تتابعات قصيرة من الدنا تعد مسئولة عن انقسام البلازميدات، بينما توفر خلايا العائل الإنزيمات التى تلزم للانقسام أما البكتيريوفاجات فإن لها تحكمًا أكثر تعقيدًا فى عملية الانقسام لا يسهل إجراء أى تعديلات عليه. ويمكن استعمال الـ phage vectors لإكثار قطع صغيرة فقط من الدنا، ولكن المشكلة يمكن التغلب عليها بالجمع بين جزء من جينوم الفاج مع بلازميد الدنا لتكوين vector جديد يعرف باسم phagemid تتضمن هذه البلازميدات الـ $ColE_1$ لبداية الانقسام، ومعلم خاص بالمقاومة لمضادات الحيوية، وتحمل نسخة إضافية من منطقة الجينات الخاصة بالبكتيريوفاج تحتوى على كل المعلومات (التعليمات) الخاصة ببداية ونهاية تمثيل الدنا، وكذلك التميز المظهرى لجزيئات البكتيريوفاج ويمكن إكثار هذه الـ vectors مثل البلازميدات بالطريقة العادية

ﻝ) Shuttle vectors

يتم تركيب الـ shuttle vectors من خلال تقنيات الهندسة الوراثية لكى تتكاثر فى خلايا نوعين من العوائل، حيث يمكنها بدء التكاثر فى أحد النوعين، ثم تنتقل إلى النوع الآخر دون أية إجراءات خاصة، وهى تتضمن معظم الـ vectors الـ eukaryotic.

ﻝ) Yeast vectors

تعتمد كل الـ vectors التى أسلفنا بيانها على الـ *E. coli*، بينما يمكن استعمال الـ yeast vectors – كذلك – فى الخمائر لإكثار أجزاء الدنا. تُعد الخمائر من الـ eukaryotes التى يمكنها النمو كخلايا مفردة وتنتج – كذلك – مستعمرات فى أطباق بترى. وأكثر الـ vectors شيوعًا فى الاستعمال (الخمائر) ربما تكون بلازميدات، مثل: الـ ARS vectors، والـ microchromosome vectors، والـ YAC vectors (أو الـ yeast artificial chromosomes)، والنوع الأخير هو الأكثر شيوعًا فى الاستعمال فى عملية زرع الجينات. يعتمد تكوين الـ YAC على تكوين جزئ دنا طويل، ربما يمثل الكروموسوم كله، ويمكن زرعه فى الخميرة ككروموسوم صناعى. ولهذه الـ vectors ثلاثة خصائص أساسية من خصائص كروموسومات الخميرة، وهى: الانقسام التلقائى التتابعى، والسنترومير centromere، والتلوميرات telomeres التى يمكن ربطها بأجزاء معينة من الدنا لتكوين كروموسومات صناعية، ويمكن إدماجها فى خلايا الخميرة. تحتوى الـ YAC – كذلك – على التتابعات الضرورية لتكاثر *E. coli*، ومواقع الـ cloning والمعلمات الخاصة selectable markers للخميرة العائل. ويمكن استعمال الـ YAC vectors فى إكثار عدة مئات من أزواج الـ kilobases مقارنة بنحو ١٠–١٥ kbp فقط فى البلازميدات، و ٢٢ kbp فى الـ lambda phage، وحتى ٤٠ kbp فى الـ cosmid vectors، إلاَّ أن استخدام الـ YAC vectors يعد أقل كفاءة.

ﻝ) Bacterial Artificial Chromosomes

تعتمد الـ vectors التى تعرف باسم الكروموسومات البكتيرية المركبة معمليًّا artificial bacterial chromosomes على ما يعرف باسم الـ Factors أو الـ fertility

factors التى توجد فى البكتيريا، وهى يمكن أن تستقبل حتى ٣٠٠ kbp من الدنا الغريب. وتعد هذه الـ vectors جزيئات دنا حلقية، وتسلك سلوك البلازميدات، ويسهل تداولها، ونقلها، وعزلها من الخلايا البكتيرية دونما إضرار بالدنا، كما أنها تتجنب كثيرًا من مشاكل الـ YAC مثل ضعف كفاءة عملية التحول الوراثى (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

إكثار واستنساخ الجينات بتقنية الـ PCR

أمكن إكثار واستنساخ الجينات بالكامل فى الـ eppendorf tube بتقنية الـ polymerase chain reaction (اختصارًا PCR) وبينما يبدأ انقسام الدنا فى الخلايا باستعمال خيط دنا قالب a template DNA strand (الذى يبدأ فى إنتاج نظيره بفعل الإنزيم DNA polymerase)، فإن انقسام الدنا فى الـ PCR لا يبدأ إلاّ من بادئ primer مهجن إلى خيط دنا تضاف إليه نيكليوتيدات أخرى تحت التأثير الإنزيمى. تكتمل العملية فى الـ PCR فى أنبوبة eppendorf يُجمع فيها بين الـ polymerase enzyme، والبادئ، والنيكليوتيدات الأربع الرئيسية التى تبدأ فى إنتاج نسخ من الدنا المطوقة flanked بزوج من البادئات.

وتتلخص خطوات الـ PCR فيما يلى:

١ – عزل خيط مزدوج كامل من الدنا dsDNA، أو يحصل على الـ cDNA ويدنتر denatures بالتسخين على ٩٥–٩٨°م؛ مما يؤدى إلى انفصال خيطين مفردين من الدنا ssDNA يخدما كقالبين templates للاستنساخ.

٢ – تضاف بادئات مركبة (مخلقة) synthetic primers (تكون عبارة عن oligonucleotides، وبمثابة قطع قصيرة من خيط مفرد من الدنا بتتابعات مناظرة للدنا المراد إكثاره target DNA) . تضاف تلك البادئات بكثرة إلى مخلوط التفاعل مع والنيكليوتيدات

٣ – يبرد مخلوط التفاعل إلى ٣٧°م؛ حيث تلتحم البادئات مع التتابعات المقابلة لها على كل من خيطى الدنا المفرد.

٤ – يضاف الإنزيم المتحمل للحرارة، Taq polymerase – الذى يُحضر من البكتيريا المتحملة للحرارة *Thermus aquaticus* – يضاف إلى مخلوط التفاعل لينشط فى بسط البادئات – على ٧٢°م – من نهاية الـ target region بإضافة نيكليوتيدات مناسبة لتكوين تتابعات دنا مقابلة.

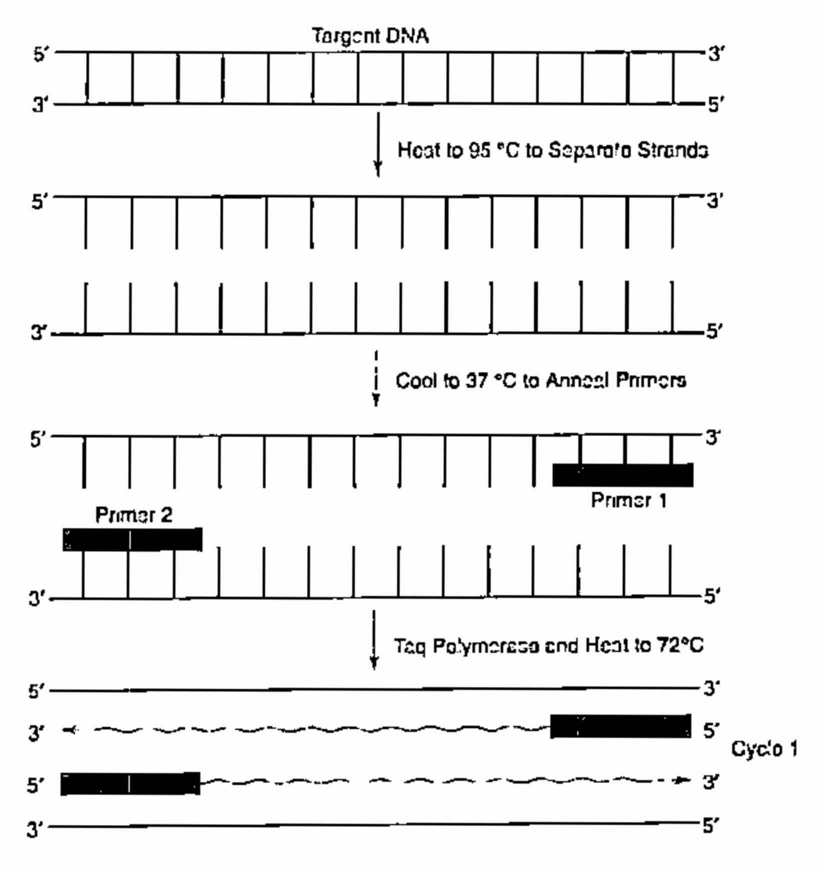
٥ – يُسمح بفترة حضانة مناسبة ليتم بسط البادئات إلى أن يكتمل تكوين نسخة من خيطى الدنا المزدوج الأصلى، وتلك هى نهاية الدورة الأولى. أى إن كل دورة تؤدى إلى مضاعفة الدنا الأصلى. ويتم تكرار الدورات برفع الحرارة لأجل دنترة الدنا .. وهكذا إلى أن تستكمل دورة ثانية، فثالثة ... إلخ. ونظريًا فإن الـ PCR ينتج $٢^{ن}$ نسخة من الدنا المطلوب، حيث ن تمثل عدد الدورات. ويعنى ذلك أن ٢٥–٣٠ دورة (وهى التى تستغرق نحو ٣–٤ ساعات) ينتج عنها ملايين النسخ من الدنا المطلوب (شكل ١١–٤).

ولطريقة الـ PCR استخداماتها المتزايدة – ليس فقط فى إكثار واستنساخ الجينات – وإنما كذلك فى عزل الجينات، وفى دراسات التطور، وفى عمل بصمة الدنا للنباتات، ورسم الخرائط الجينومية، وفى التحقق من التحول الوراثى، وتمييز الهجين الجسمية.

هذا . وقد استخدمت حديثًا إنزيمات DNA polymerase جديدة، مثل VENT polymerase المستخلص من البكتيريا *Thermococus litoralis*، وأيضًا polymerase آخر مستخلص من البكتيريا *Pyrococcus furiosus*، وهما يفضلان الـ Taq polymerase فى جوانب معينة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

المكتبة الجينومية

يعرف الجين الذى يُراد عزله لأجل إكثاره باسم DNA insert. تتوقف الطريقة التى يُعزل بها الجين على طبيعته والمعلومات التى تتوفر عنه وعن البروتين الذى يتحكم الجين فى إنتاجه. ويمكن عزل الجين إما بصورة مباشرة باستخلاص الدنا الخاص به من الجينوم، أو باستخدام المعلومات التى يحملها الرنا الرسول الذى ينتج مقابل الجين، لكن فى كلتا الحالتين يتعين عمل خريطة لأجزاء الدنا تمثل الجينوم النباتى، إما على صورة مكتبة جينومية genomic library، وإما على صورة مكتبة للدنا المستنسخ من الرنا الرسول cDNA library.

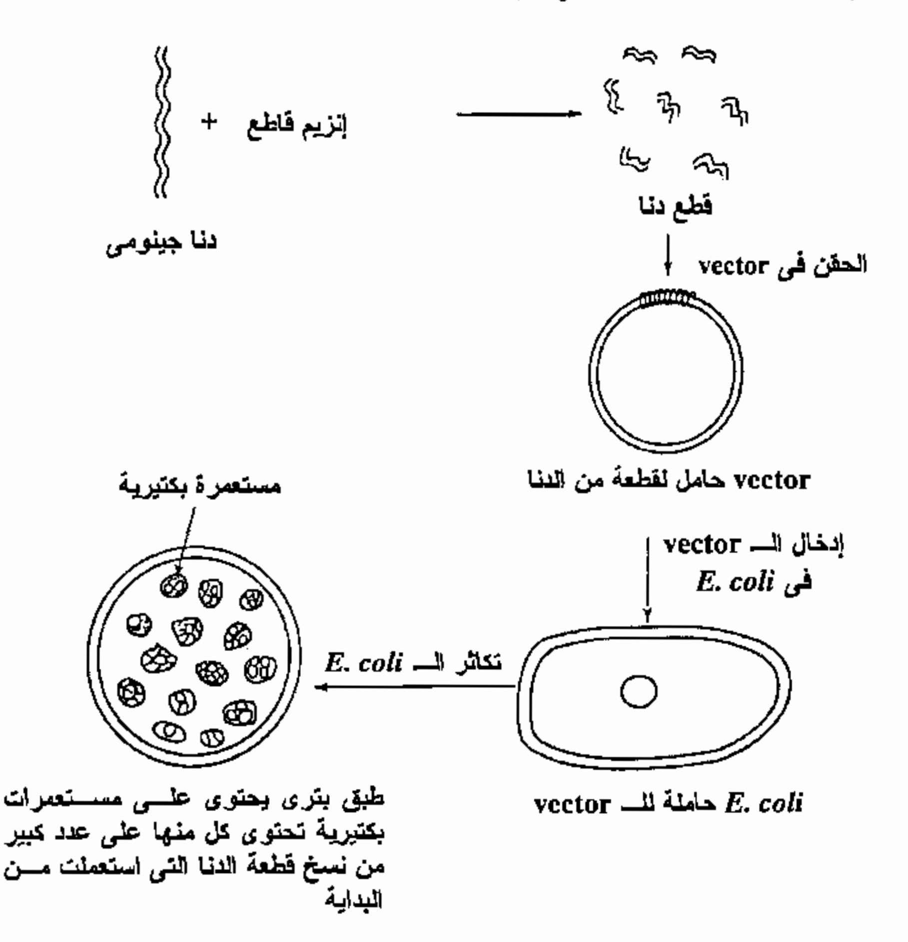


شكل (١١-٤) خطوات الـ **polymerase chain reaction**.

مقارنة بين الـ genomic library، والـ cDNA library

تُمثِّل الـ genomic library دنا الجينوم الكامل الموجود بنواة النوع النباتى المعنى، والذى يكثر - عادة - فى صورة قطع كبيرة، وهو يتضمن كل أجزاء الدنا، تتساوى فى ذلك كلاً من الأجزاء التى يُعبر عنها والتى لا يعبر عنها، والتى يمكن عزل الجين المرغوب فيه منها بغربلة المكتبة بمساعدة مجسات probes مناسبة، لكن حقيقة ما يحدث أن بعض أجزاء الدنا قد لا تُمثَّل، بينما قد يُمثَّل بعضها الآخر أكثر من اللازم يعزل الدنا الكلى ويقطَّع إلى أجزاء صغيرة باستعمال الـ restriction enzymes، ثم تدمج هذه القطع فى vector مناسب (فيرس، أو بلازميد، أو كوزميد، أو YAC، أ، BAC)، حيث يحقن - بدوره - فى عائل مناسب مثل *E. coli* لكى يتكاثر. يؤدى التكاثر المستمر

لخلايا العائل إلى إنتاج عدد كبير من المستعمرات التى تحمل أجزاء الدنا (شكل ١١-٥). وبذا .. فإن الـ genomic library تتكون من مجموعة من الـ restriction fragments المتداخلة overlaping موزعة عشوائيًّا فى vector مناسب، وتحمل كل مستعمرة (سلالة clone) منها قطعة من الدنا الخلوى (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).



شكل (١١-٥): إنشاء مكتبة جينومية.

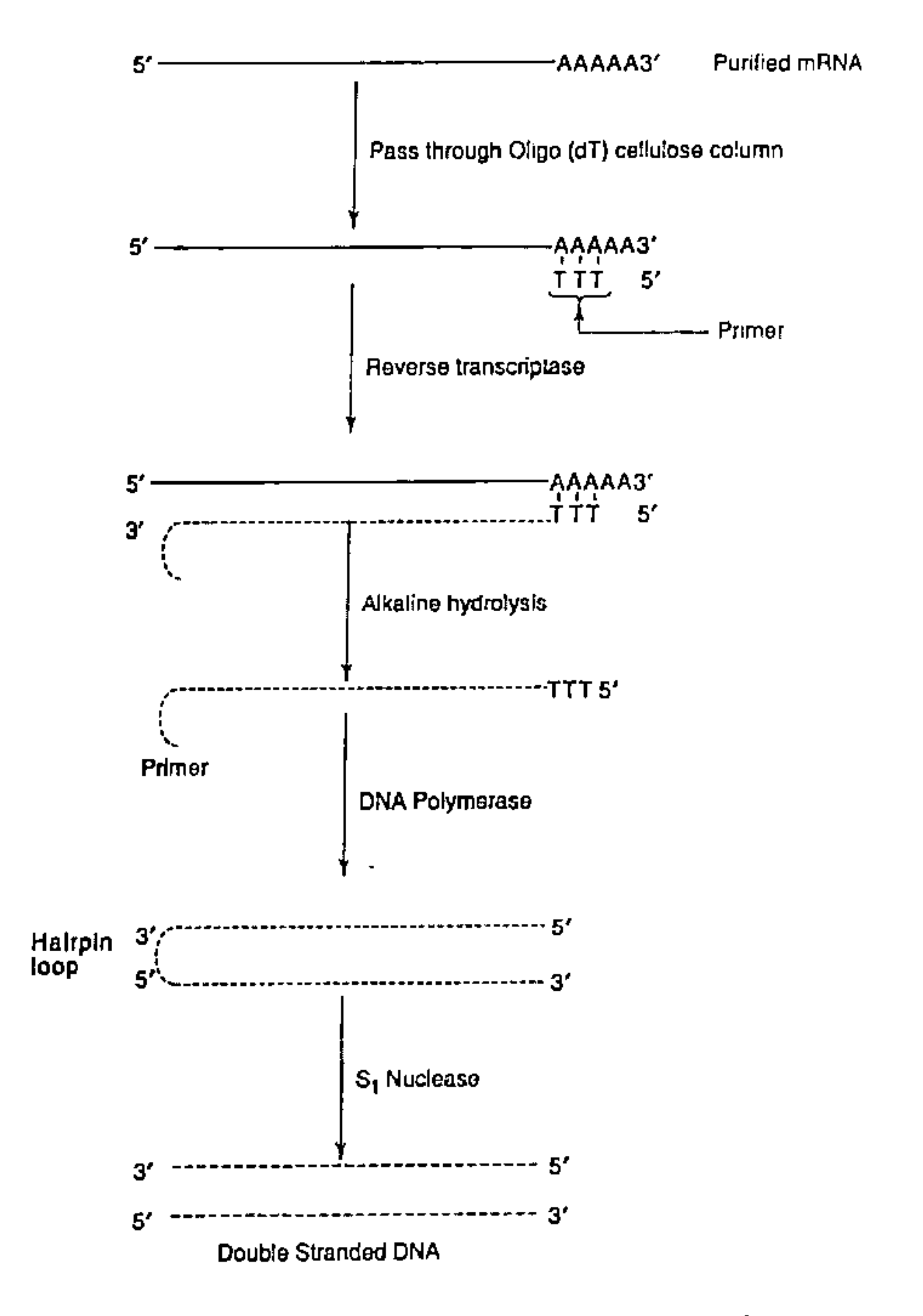
وبالمقارنة بالـ genomic library، فإن الـ cDNA library تتكون فقط من ذلك الجزء من الجينوم الذى يُعبَّر عنه على صورة mRNA، والذى يتم تمثيل الدنا المقابل منه - أى يتم تمثيل الـ cDNA - باستعمال الـ reverse transcriptase enzyme. ويؤدى تجميع كل أجزاء الـ cDNA فى vector مناسب - مثل البلازميدات - فى مستعمرات

بكتيرية إلى تكوين الـ cDNA library ويمكن بهذه الطريقة انتخاب الأنسجة التى يُعبّر فيها عن الجينات المرغوب فيها لأجل عمل cDNA libraries خاصة بتلك الأنسجة، فمثلا لأجل عزل الجينات المسئولة عن إنتاج البروتينات، يُعزل الـ mRNA الكلى من البذور النامية للمحاصيل ذات محتوى البذور البروتينى العالى. ويلى ذلك تنقية الـ mRNA بطريقة خاصة وتهجينه مع primer خاص يعمل كبادئ للإنزيم reverse transcriptase (أى RNA- dependent DNA polymerase) الذى يستعمل الـ RNA كقالب template لتمثيل خيط الدنا المقابل (شكل ١١-٦). وفى نهاية الأمر نجد أن تتابعات النيكليوتيدات فى الرنا الرسول تتحول إلى خيط مزدوج من الدنا يطلق عليه - عادة - اسم complementary DNA، أو copy DNA، أو cDNA. ويؤدى إكثار الـ cDNA إلى تكوين مكتبة من تلك الجينات التى تشفر بسهولة لعدم احتوائها على الـ introns التى توجد فى الـ splitgenes. وبذا فإن تلك التقنية تزيد من فرصة الحصول على الجين المرغوب فيه نظرًا لصغر حجم المكتبة عما فى الـ genomic library (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

التعرف على الجين فى المكتبة

تحتوى المكتبة على مستعمرات بكتيرية تحتوى كل منها على قطع مختلفة من الدنا تمثل الجينوم الكامل، وهو الذى يتعين غربلته للتعرف على المستعمرات التى تحتوى على قطع الدنا المرغوب فيها. وإذا ما عرفت بعض التتابعات فى الجين المعنى، فإنه يمكن التعرف عليها بالتهجين مع مجس محدد معلم بالمستعمرة. وتستعمل لهذا الغرض عديد من التقنيات، مثل Northern blotting، والـ Western blotting، والـ Southern blotting (أو DNA/DNA hybridization) فى التعرف على الجين المرغوب فيه.

فعلى سبيل المثال.. يتضمن التعرف على الدنا المرغوب فيه بطريقة الـ Southern blotting عزل الدنا وهضمه بـ endonuclease، وفصل القطع المختلفة بالـ gel electrophoresis. ويلى ذلك طبع هذه القطع (plotting) من الجل الخاص بالدنا لعزل



شكل (١١-٦): تنقية رنا رسول متعدد الأدينين، وتمثيل الـ cDNA.

إلى مرشح filter بضغط مرشح من النيتروسيليلوز nitrocellulose filter على طبق البترى الذى تنمو فيه المستعمرات تمثل هذه المرشحات مكررات مكتبة الدنا التى يمكن غربلتها، بينما يُحافظ على الأطباق للرجوع إليها عند اللزوم. يعامل المرشح بهدف تثبيت الدنا، وذلك بدنترة denaturation الدنا بمعاملة قلوية، ويتم التعرف على الدنا بتهجينه مع مجس معلم إشعاعيًا ويمكن بالـ autoradiography التعرف على وضع المستعمرة المرغوب فيها على المرشح الذى يتم تعريفها وتفريغها من الموضع المقابل بالطبق (شكل ١١-٧)

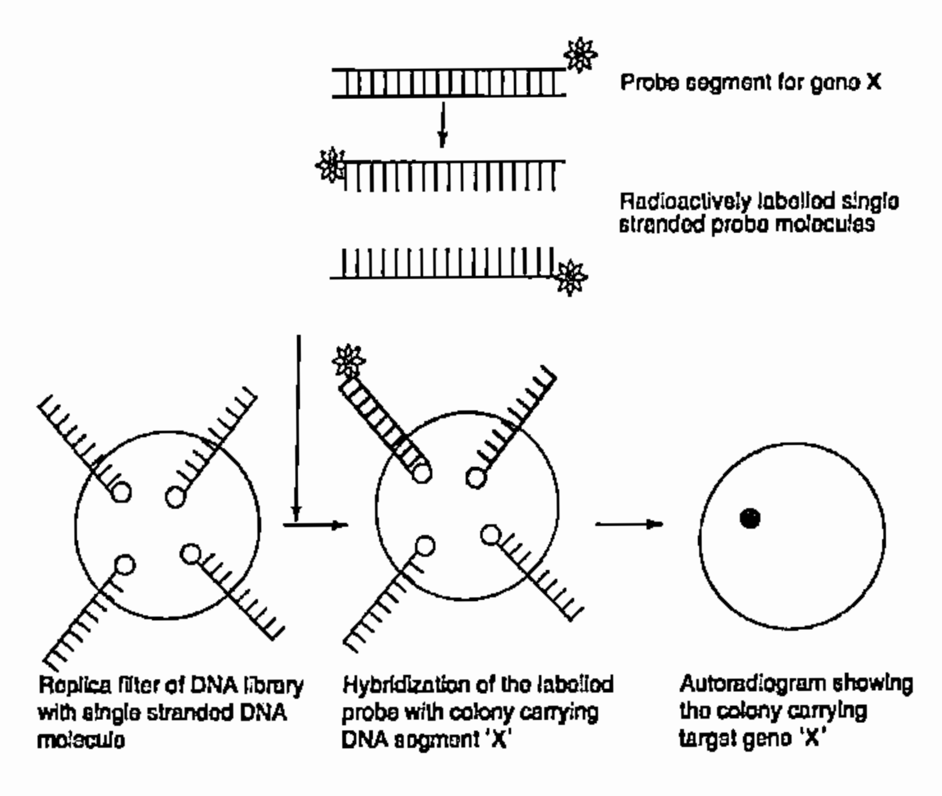
ومن بين الطرق الأخرى التى تستعمل فى التعرف على الجينات المرغوب فيها، ما يلى:

١ – طريقة الـ chromosome walking:

إن الـ chromosome walking هى عملية عزل قطع الدنا المتداخلة overlapping فى الـ genomic DNA من الـ DNA library، وتستعمل القطع الطرفية بكل مستعمرة كمجسات متتالية للتهجين (شكل ١١-٨) تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن المستعمرات التى تحتوى على أجزاء دنا متجاورة يوجد بها قطع متداخلة، بما يسمح بـ "السير" على امتداد طول الكروموسوم إلى أن يتم تحديد مواضع الجين المرغوب فيه. ولا تصلح هذه التقنية إلا فى الحالات التى تتوفر فيها خرائط وراثية ارتباطية كاملة.

٢ – طريقة الـ transposon tagging:

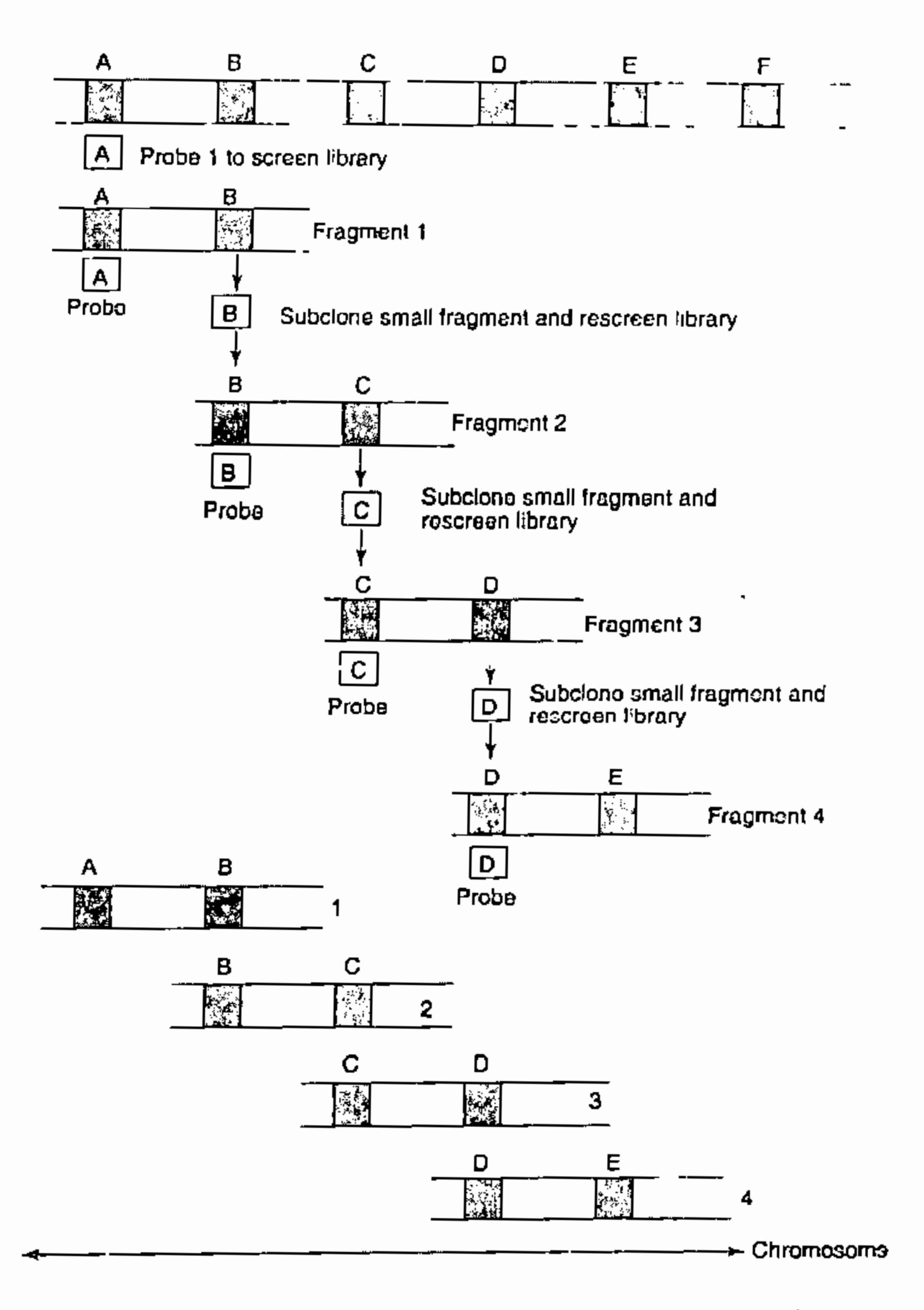
تتواجد الـ transposons (التى تعرف – كذلك – باسم jumping genes) فى عديد من الأنواع النباتية، وهى قادرة على القفز jump أو تغيير مكانها transpose من موقع جينومى لآخر فى نفس الكروموسوم أو فى كروموسوم آخر، مما يؤدى إلى اختلاف التعبير الجينى فى الموقع الجديد، بما يعنى حدوث طفرة ويمكن استعمال هذه الـ transposones كمجسات لعزل التتابعات التى اندمج فيها الـ transposone، وبذا يمكن تحديد الجينات المتأثرة بالـ transposones.



شكل (١١-٧): تهجين الدنا مع الدنا للتعرف على قطعة الدنا المرغوب فيها.

٣ - تقنية الـ **differencial screening**:

يهدف الـ differential screening للـ cDNA libraries إلى عزل مجموعات من الجينات التي تتحكم في بعض الصفات أو العمليات الخاصة، مثل الإصابة بمسببات الأمراض، والمسار الأيضي المعبر عنه في نسيج معين، أو في عضو معين مثل الأزهار، والجذور، والثمار ... إلخ. وتعتمد التقنية على تعبيرات خاصة بالجينات تُسْتَحث بفعل بعض العمليات أو بتعبيرات جينية تختص بأنسجة معينة. يتم جسّ الـ cDNA library التي تقام من الـ mRNA المستخلص من الأنسجة المستحثة .. تُجسّ بواسطة مجموعتين من المجسات المعلمة إشعاعيًا radiolabelled probes. فمثلاً .. لعزل cDNA خاص بالأزهار، تقام cDNA library من الـ mRNA، ويلي ذلك غربلة فلاتر هذه المكتبة باستعمال mRNA خاص بالأزهار معلم إشعاعيًا أو cDNA، بينما تغربل مجموعة أخرى



شكل (١١-٨): طريقة الـ **chromosome walking** للتعرف على الجينات.

من الفلاتر ذاتها بـ mRNA خاص بالأوراق معلم إشعاعيًا. يتم التعرف على الـ cDNAs الخاصة بالأزهار كبقع لا تضئ إلاّ بمجسات الـ mRNA الخاص بالأزهار أما البقع الأخرى التى تتهجن - كذلك - بالـ mRNA الخاص بالأوراق فإنها تمثل جينات الـ house keeping. يفيد عزل الجينات بهذه الطريقة فى التعرف على تلك التى تتحكم فى بعض العمليات الحيوية الخاصة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الإنزيمات المستعملة فى مجال الـ Gene Cloning

منذ أن اكتشفت الإنزيمات القادرة على قطع شريط الدنا عند تتابعات معينة من النيكليوتيدات، واكتشاف إنزيمات الليجيز ligase القادرة على وصل قطع الدنا معًا .. أصبح من الممكن تحفيز تكوين أى توافيق جديدة من الجينات فى المختبر، وتزويدها بتتابعات دنا يمكنها تنظيم عملية التعبير عن تلك الجينات فى النباتات المحولة وراثيًا فى المرحلة المناسبة من النمو (temporal expression)، وفى الأنسجة التى يُراد التعبير فيها (spatial expression).

توفر إنزيمات القطع restriction enzymes وإنزيمات الوصل الخاصة بالدنا DNA ligase عمليات القطع والوصل لأجزاء الدنا، وهى التى تعد ضرورية لإنتاج جزيئات دنا جديدة recombinant DNA molecules. أما الإنزيمات الأخرى التى تستعمل فى مجال الهندسة الوراثية فإنها تعرف مجتمعة بإنزيمات تحوير الدنا DNA modifying enzymes، وهى تقوم بعمليات التحلل degradation، والتمثيل synthesis، والتحوير alteration للدنا.

تحلل إنزيمات النيوكلييز nucleases الأحماض النووية بكسر الروابط الـ phosphodiester التى تربط النيكليوتيدات معًا. وتعد إنزيمات القص من الأمثلة الجيدة للـ endonucleases التى تقطع الدنا فى مواقع داخل الخيوط. وتوجد مجموعة أخرى من الـ nucleases تقوم بتحليل الدنا من جزيئاته الطرفية، وهى التى تعرف باسم exonucleases (عن Nicholl ١٩٩٤).

إنزيمات القطع

يلزم عند تكوين جزئ دنا جديد recombinant DNA molecule قطع الحامض النووى الحلقى للناقل فى نقطة واحدة محددة، هى التى يمكن عندها إيلاج جزئ الدنا المراد زراعته . ويتعين أن يحدث القطع فى جزيئات الناقل فى نفس مكان القطع فيها جميعًا. يتحقق ذلك بفضل إنزيمات القطع الداخلية restriction endonucleases التى تقوم بقطع الدنا فى مواقع محددة

ولقد عزل أول تلك الإنزيمات من *Haemophilus influenzae* فى عام ١٩٧٠، وتعرف حاليًا عديد من تلك الإنزيمات التى أمكن عزلها من أنواع بكتيرية كثيرة ومتباينة

تتميز معظم الأنواع البكتيرية بالقدرة على مقاومة الدنا الغريب عنها، فهى تحتوى على إنزيمات خاصة من الـ endonucleases (الإنزيمات القاطعة المحددة restriction enzymes) وتقوم البكتيريا بحماية دناها الخاص من التأثير القاتل المحتمل لإنزيماتها القاطعة المحددة بتحويره مسبقا – عادة – بواسطة DNA methylase مناسب، يؤدى إلى مثلمة methylation بعض القواعد الآزوتية للدنا عند تتابعات محدودة، فلا يمكن للإنزيمات التعرف عليها كمواقع للقطع

ونظرًا لأن الإنزيمات القاطعة المحدِّدة استخدمت تقليديًا لأجل تقطيع أوصال الدنا، فإنها أصبحت تُعرَّف – أساسا بالتتابعات التى تتعرف عليها لأجل قطع الدنا عندها ويمكن للغالبية العظمى من تلك الإنزيمات تمييز تتابعات يتراوح طولها بين ٤، و ٦ نيكليوتيدات، إلاّ أن البعض منها يمكنه التعرف على تتابعات تصل إلى ثمانى نيكليوتيدات يقوم الإنزيم بقطع الدنا فى كل موضع يتضمن تتابع أزواج القواعد الآزوتية التى يمكنه التعرف عليها فيه، ولذا فإنه كلما قل عدد النيكليوتيدات فى أى موقع تعرُّف للإنزيم كلما زاد عدد مرات قطع الإنزيم للدنا (Webb & Wilson ١٩٩١)

تعرف ثلاثة طرز من الإنزيمات القاطعة restriction enzymes، هى I، و II، و III، ومعظم ما يستعمل منها حاليًا هو من الطراز II، وهو أبسطها من حيث طريقة فعله. تعد هذه الإنزيمات من التى تعمل فى النواة nucleases ونظرًا لأنها تقطع خيط

الدنا فى موقع داخلى منه (مقارنة بتلك التى تبدأ القطع عند أحد الأطراف)، لذا .. فإنها تعرف باسم endonucleases، ومن هنا جاء اسمها الكامل type II restriction endonucleases، ولكنها غالبًا ما تسمى restriction enzymes للتبسيط، وهى فى جوهرها مقصات جزيئية.

تعطى الإنزيمات القاطعة أسماء متباينة، ويشكل اسم الكائن الذى اكتشف فيه الإنزيم لأول مرة الجزء الأول من اسم هذا الإنزيم، حيث يؤخذ من الكائن الحرف الأول من اسم جنسه، والحرفين الأولين من اسم نوعه. وبذا .. فإن إنزيمًا قاطعًا من سلالة من البكتيريا *Escherichia coli* يأخذ الرمز Eco، وآخر من البكتيريا *Bacillus amyloliquefaciens* يأخذ الرمز Bam ... وهكذا. ويمكن أن يدخل فى اسم الإنزيم مواصفات أخرى، مثل السلالة البكتيرية. ومن أكثر الإنزيمات استخدامًا من بين تلك المشار إليها أعلاه EcoRI، و BamHI.

وترجع أهمية الإنزيمات القاطعة إلى تخصصها، فكل إنزيم منها لا يمكنه التعرف إلاّ على تتابعات محددة من القواعد الآزوتية بالدنا. وأكثر التتابعات التى تميز بتلك الإنزيمات شيوعًا تتكون من أربعة أزواج من القواعد، أو خمسة، أو ستة أزواج طولاً. وعليه .. فمع العلم بأنه يوجد أربعة من القواعد فى الدنا، وبافتراض أن توزيعها عشوائى .. فإن المعدل المتوقع لأى تتابع يكون ٤^ن، حيث ن هى طول التتابع المعنى. ويعنى ذلك أن موقعًا يحتوى على أربعة تتابعات محددة يمكن أن يقع مرة فى كل ٢٥٦ حالة لأربعة تتابعات، بينما يمكن أن يقع تتابع محدد لخمس قواعد مرة فى كل ١٠٢٤ حالة، ويقع التتابع المحدد لست قواعد مرة فى كل ٤٠٩٦ حالة. ونظرًا لأن القواعد الآزوتية لا تكون موزعة عشوائيًا - بطبيعة الحال - فإن النسب المختلفة لأطول التتابعات المختلفة تختلف - عمليًا - عن النسب المتوقعة لها، والتى تعد مجرد مؤشرات إلى احتمالات حدوثها. وبناء على ما أسلفنا بيانه .. فإن الإنزيم الذى يمكنه التعرف على تتابع معين لأربع نيكليوتيدات (والذى يسمى أحيانًا قاطع الأربع four-cutter) سوف ينتج أجزاء من الدنا أقصر من تلك التى ينتجها قاطع الست.

ويعطى جدول (١١-١) أمثلة لأكثر الإنزيمات القاطعة استعمالاً والتتابعات التى

يمكن لتلك الإنزيمات التعرف عليها، وأين يحدث القطع (عن Nicholl ١٩٩٤)، كما يعطى جدول (١١-٢) مزيدًا من التفاصيل عن تلك الإنزيمات وغيرها (عن Chawla ٢٠٠٠).

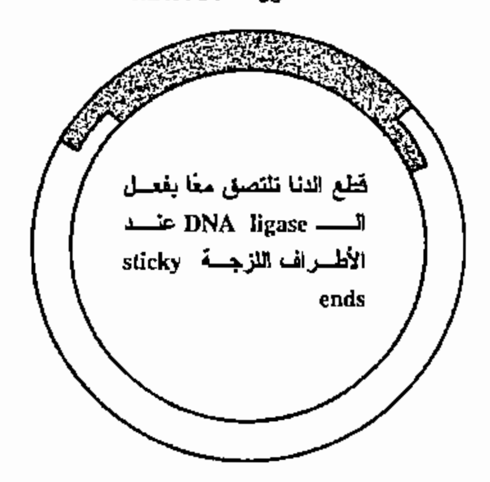
جدول (١١-١): مواقع القَطع التى تتعرف عليها إنزيمات القطع فى تتابعات الحامض النووى وأنواع نهايات سلاسل النيكليوتيدات التى تترتب على عملية القطع.

الإنزيم	التتابعات التى يتعرف عليها	مواقع القطع	النهايات
BamHI	5′-GGATCC-3′	G↓GATCC CCTAG↑G	5′
EcoRI	5′-GAATTC-3′	G↓AATTC CTTAA↑G	5′
HaeIII	5′-GGCC-3′	GG↓CC CC↑GG	Blunt
HpaI	5′-GTTAAC-3′	GTT↓AAC CAA↑TTG	Blunt
PstI	5′-CTGCAG-3′	CTGCA↓G G↑ACGTC	3′
Sau3A	5′-GATC-3′	↓GATC CTAG↑	5′
SmaI	5′-CCCGGG-3′	CCC↓GGG GGG↑CCC	Blunt
SstI	5′-GAGCTC-3′	GAGCT↓C C↑TCGAG	3′
XmaI	5′-CCCGGG-3′	C↓CCGGG GGGCC↑C	5′

وتنتج إنزيمات مثل PstI، و EcoRI قِطَع دنا ذات أطراف "لزجة" sticky، نظرًا لأن التتابعات البارزة منها يمكنها التقارن مع القواعد ذات التتابعات المكملة لها والتى ينتجها الإنزيم ذاته. وبذا . فإنه يمكن بقطع عينتان من الدنا بإنزيم واحد ثم خلط قطع الدنا الناتجة معًا الحصول على دنا جديد انعزالى recombinant DNA، كما يظهر شكل (١١-٩). ويعد ذلك من أهم استعمالات إنزيمات القص.

جدول (١١-٢): بيان ببعض الإنزيمات القاطعة، وخصائصها، والكائنات التى تقوم بإنتاجها.

الإنزيم	الكائن المنتج له	التابعات التى يتعرف عليها
Staggered cut (sticky ends)		
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	G↓GATCC
BglII	*Bacillus globigi*	A↓GATCT
EcoRI	*Escherichia coli* R	G↓AATTC
HindIII	*Haemophilus infuenzae* Rd	A↓AGCTT
PstI	*Providencia stuartii*	CTGCA↓G
SalI	*Streptomyces albus* G	G↓TCGAC
TaqI	*Thermus aquaticus*	T↓CGA
PstI	*Providencia stuartii*	CTGCA↓G
Blunt ends		
AluI	*Arthrobacter luteus*	AG↓CT
HaeIII	*Haemophilus aegypticus*	GG↓CC
HpaI	*Haemophilus parainfuenzae*	GTT↓AAC
PvuII	*Proteus vulgaris*	CAG↓CTG
Sau3A	*Staplylococcus aureus* 3A	↓GATC
SmaI	*Serratia marcescens*	CCC↓GGG



شكل (١١-٩): تكوين دنا جديد **recombinant DNA**، وذلك بوصل قطع دنا من مصادر مختلفة بعضها ببعض عند أطرافها اللزجة **sticky ends**؛ وهى الأطراف التى تتكون بفعل عديد من إنزيمات القص **restriction enzymes**، ويحدث الالتحام بفعل إنزيم وصل الدنا **DNA ligase**.

تستعمل الإنزيمات القاطعة بطريقة بسيطة للغاية، حيث تضاف كمية مناسبة من الإنزيم إلى الدنا المعنى فى محلول منظم، مع تحضين التفاعل على ٣٧°م. يتم التعبير عن النشاط الإنزيمى بالوحدات، تحدد كل وحدة منها بكمية الإنزيم التى يمكنها هضم (قص) ميكروجرام واحد من الدنا خلال ساعة واحدة على ٣٧°م. وعلى الرغم من تتطلب معظم الدراسات إجراء هضم كامل للدنا المعنى، فإن هناك حالات تستخدم فيها توافيق مختلفة من تركيز الإنزيم مع وقت التحضين لتحقيق هضم جزئى فقط.

يتوقف نوع جزئ الدنا الذى ينتجه إنزيم معين على كل من التتابع الذى يتعرف عليه الإنزيم، وعلى موقع القطع داخل ذلك التتابع. وكما أسلفنا فإن طول قطعة الدنا يتوقف على معدل حدوث التتابع الذى يمكن للإنزيم التعرف عليه على امتداد الدنا ويحدد مكان القطع الفعلى للإنزيم نوع النهايات المكنة لقطع الدنا المقطوعة. ولذلك أهمية كبيرة بالنسبة لعمليات التداول التالية للدنا

ويمكن أن تنتج ثلاثة طرز من النهايات لقطع الدنا، هى (شكل ١١-١٠).

١ – قطع دنا ذات نهايات مسطحة blunt ends

٢ – قطع دنا تبرز منها الـ 3′ends.

٣ – قطع دنا تبرز منها الـ 5′ends (عن Nicholl ١٩٩٤).

أ	*Hae*III	*Pst*I	*Eco*RI
ب	5′-GGCC-3′	5′-CTGCAG-3′	5′-GAATTC 3′
جـ	GG↓CC CC↑GG	CTGCA↓G G↑ACGTC	G↓AATTC CTTAA↑G
د	Blunt	3′-protruding	5′-protruding

شكل (١١-١٠): أنواع النهايات التى تحدث بفعل أنواع مختلفة من إنزيمات القص تُميز الإنزيمات فى الشكل بكل من: (أ) التتابعات التى يمكنها التعرف عليها، و (ب، جـ) مواقع القص، و (د) نوعيات النهايات التى تتكون نتيجة لذلك.

وتجدر الإشارة إلى أن معظم المواقع تحتوى على محورين متناظرين، وتكون القواعد الآزوتية فى الموقع محددة بصورة فريدة، إلا أن ذلك لا يصدق فى كل الحالات. تقوم الإنزيمات القاطعة التى تتعرف على المواقع المتناظرة بقطع بصورة متناظرة فى الموقع ذاته وفيما يجاوره، بينما تقوم الإنزيمات القاطعة التى تتعرف على المواقع غير المتناظرة assymetrical sites بقطع الدنا فى مكان يبعد بمسافة عن الموقع ذاته.

وكما أسلفنا فإن لطبيعة القطع أهمية كبيرة؛ نظرًا لأن النهايات المترتبة على عملية القطع تحدد مدى مناسبة قِطَع الدنا الناتجة للإجراءات التى تلى عملية القطع. إن جميع الإنزيمات القاطعة تقطع الدنا الذى تعمل عليه؛ لتنتج نهاية 5′phosphate، و 3′hydroxy على كل خيط عند كل قطع. ويمكن لتلك الكسور أن تنتظم لتعطى إما 5′phosphate overhangs (شكل ١١-١١أ)، وإما 3′hydroxyl overhangs (شكل ١١-١١ب)، وإما قد تعطى الكسور نهايات blunt (شكل ١١-١١جـ).

```
أ   ...GAATTC...   EcoRI    ...G3'        5'AATTC...
    ...CTTAAG...  ------>   ...CTTAA           G...

ب   ...CTGCAG...   PstI     ...CTGCA3'        5'G...
    ...GACGTC...  ------>   ...G          ACGTC...

جـ  ...CCCGGG...   SmaI     ...CCC3'        5'GGG...
    ...GGGCCC...  ------>   ...GGG           CCC...
```

شكل (١١-١١): ثلاثة نهايات يمكن أن تتكون نتيجة لقطع الدنا بالإنزيمات القاصة، هى: (أ) 5′-overhangs، و (ب) 3′-overhangs، و (جـ) النهايات المتساوية **blunt ends**.

يؤدى هضم الدنا بتلك الإنزيمات إلى إنتاج أجزاء متباينة الطول، حسب توزيع مواقع القطع فى الدنا. ويمكن فصل تلك الأجزاء بالـ gel electrophoresis (Webb & Wilson ١٩٩١).

تحتوى معظم قطع الدنا على مواقع التعرف لمختلف إنزيمات القص، ويكون – غالبًا – من المفيد التعرف على المواقع النسبية لبعضها البعض. وتعرف التقنية التى تستعمل للحصول على هذه المعلومات باسم restriction mapping. ويتضمن ذلك قطع جزء من

الدنا بعدد من إنزيمات القص المختارة إما منفردة، وإما فى توافيق مختلفة. يلى ذلك تمرير القطع الناتجة فى agarose gel لأجل فصل الأحجام وتحديدها. ويمكن من نتائج ذلك الاختبار تحديد المواقع النسبية لأماكن القطع.

نفترض - مثلاً - أننا نرغب فى رسم خريطة أماكن القطع لإنزيمات القطع BamHI، و EcoRI، و PstI، وأن الدنا المعنى يبلغ طوله ١٥ kb. يتم إجراء عدة عمليات هضم، ثم تمرر قطع الدنا الناتجة فى جل الأجاروز وتحدد أحجامها (جدول ١١-٣). ونظرًا لأن كل عملية قطع إنزيمى ينتج عنها قطعتان من الدنا، فإنه يمكننا الاستنتاج بأن الدنا يوجد به مكان قطع واحد لكل إنزيم ويمكّن الهضم المزدوج (باستعمال إنزيمين) من رسم خريطة جزيئية، ويؤكد الهضم الثلاثى (باستعمال ثلاثة إنزيمات) تلك الخرائط (شكل ١١-١٢) (عن Nicholl ١٩٩٤)

جدول (١١-٣): هضم قطعة دنا طولها 15 kb باستعمال ثلاثة إنزيمات قاطعة[أ]

BamHI	EcoRI	PstI	BamHI + EcoRI	BamHI + PstI	EcoRI + PstI	BamHI + EcoRI + PstI
14	12	8	11	8	7	6
1	3	7	3	6	5	5
			1	1	3	3
						1

أ - القيم التى تظهر بالجدول هى بالـ kb لقطع الدنا التى تتكون نتيجة لهضم القطعة الـ 15kb باستعمال إنزيمات BamHI، و EcoRI، و PstI وتظهر نتائج عمليات الهضم الفردى والمزدوج والثلاثى كما هو مبين بالجدول.

الإنزيمات النووية nucleases الأخرى

بخلاف إنزيمات القطع فإنه تعرف أربعة أنواع من الـ nucleases التى غالبًا ما تستعمل فى مجال الهندسة الوراثية، وهى:

Bal 31 (exonuclease)
exonuclease III (exonucleas)
deoxyribonuclease I or Dnase I (endonuclease)
S_1-nuclease (endonuclease)

النباتات الوحيدة الفلقة التى تستعصى إصابتها بالبكتيريا يمكن - تحت ظروف خاصة - تحويلها وراثيًا بالأجروباكتيريم (عن Jahne وآخرين ١٩٩٥).

وكما سبق أن أوضحنا .. فقد ثبت إمكان نقل الـ T-DNA من الأجروباكتيريم إلى الخلايا النباتية لعديد من وحيدات الفلقة الهامة، مثل الذرة، والأرز، والقمح. ولقد وجد فى الذرة أن النبات ينتج مركب أيض ثانوى ذات فعل بكتيرى مثبط يمنع حث الـ vir genes، إلا أن هذا المركب ليس ثابتًا، حيث أدت فترة من الزراعة فى مزارع الأنسجة قبل التلقيح بالبكتيريا، أو إطالة فترة مزرعة الأنسجة مع البكتيريا إلى التغلب على هذا التأثير المثبط.

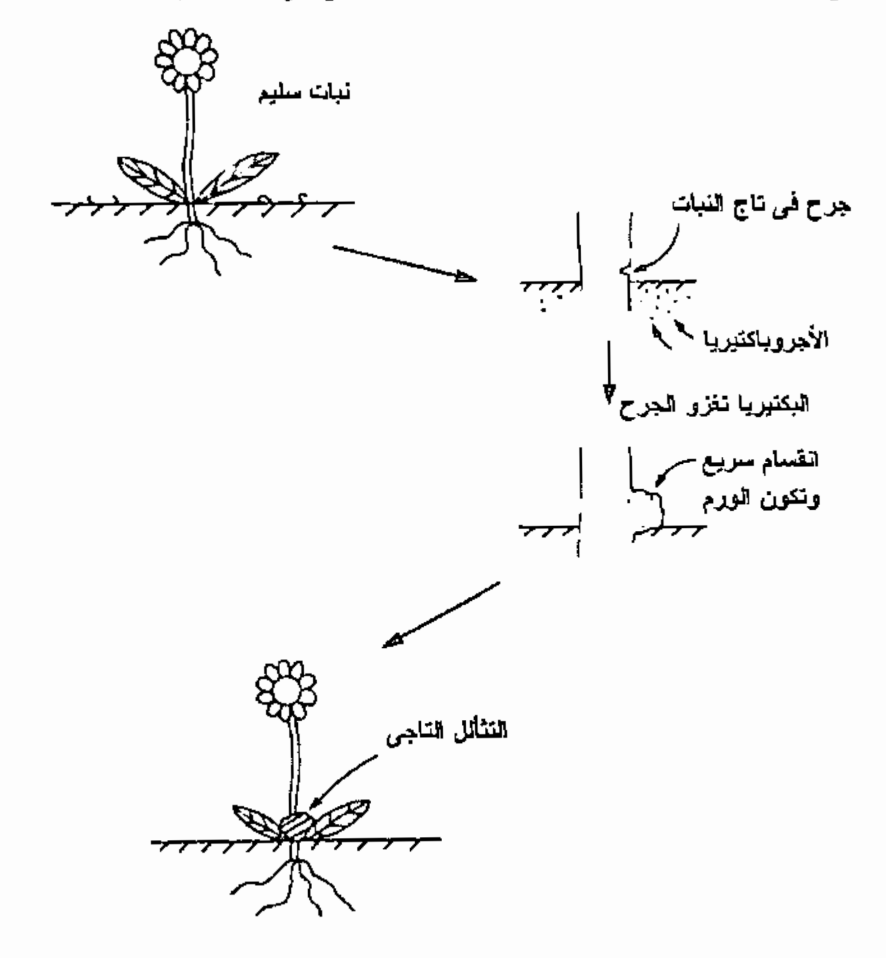
هذا وتنتج سلالات الأجروباكتيريم المختلفة آليلات خاصة من الـ vir A gene، يمكن لبعضها أن يشفر لبروتين vir A غير حساس للمركب الأيضى الثانوى الذى تطلقه النباتات الأحادية الفلقة. ولذا . فإنه من الضرورى فى عمليات التحول الوراثى للنباتات الأحادية الفلقة استعمال سلالة أجروباكتيريم تحتوى على جين vir A متوافق معها (عن Block ١٩٩٣).

كذلك أمكن زيادة كفاءة التحويلات الوراثية المعتمدة على بكتيريا الأجروباكتيريم، والتغلب على مشكلة عدم قدرة البكتيريا على إصابة عوائل معينة باللجوء إلى الترددات الصوتية العالية sonication. وفى هذه الطريقة يُعَرَّض النسيج النباتى المستهدف لفترات قصيرة من الموجات الصوتية الفائقة ultrasound فى وجود الأجروباكتيرم. ولقد أمكن بهذه الطريقة الحصول على تحويلات وراثية ثابتة فى فول الصويا. وأوضح التحليل الهستولوجى أن المعاملة أحدثت فى النسيج النباتى تشققات دقيقة ومتجانسة وقنوات، وهى التى ربما تكون قد ساعدت فى تسهيل الإصابة بالبكتيريا (عن Simmond & Smartt ١٩٩٩)

باثولوجى الإصابة بالأجروباكتيريم

عندما تحدث الجروح فى منطقة تاج النبات - أو فى أى مكان آخر منه - فإنه يمكن أن تحدث العدوى بالبكتيريا *A. tumefaciens* بسهولة، حيث تبدأ الخلايا النباتية فى

مكان الإصابة فى الانقسام والتضخم لتكون ورمًا tumor، أو ما يعرف بالتثألل التاجى (شكل ١٢-٢)، ثم تبدأ فى تمثيل مشتق من الأرجنين يطلق عليه اسم أوبين opine، يكون - عادة - إما نوبالين nopaline، وإما أوكتابين octapine، الأمر الذى يتوقف على سلالة الأجروباكتيريم المستعملة فى العدوى. تستخدم هذه الأوبينات كمصادر للطاقة بواسطة البكتيريا. وجدير بالذكر أن سلالات بكتيريا الأجروباكتيريم التى تستحث تمثيل النوبالين يمكنها النمو على النوبالين وليس الأوكتابين، والعكس بالعكس. وبينما توجه البكتيريا أيض النبات لإنتاج الأوبينات التى تستفيد منها كمصدر للطاقة، فإن تلك المركبات ليست لها فائدة للنبات (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).



شكل (١٢-٢): كيفية ظهور أعراض التثألل التاجى **crown gall**

وعند وصف إنزيم polymerase يستعمل مصطلح DNA-dependent، أو RNA-dependent للدلالة على نوع الحامض النووى الذى يستعمله الإنزيم كقالب له. وبذا .. فإن DNA-dependent DNA polymerase ينسخ الدنا ليكون دنا جديد، والـ RNA-dependent RNA polymerase ينسخ الرنا ليكون رنا جديد. وتقوم تلك الإنزيمات بتمثيل الأحماض العضوية بوصل نيكليوتيدات معًا تكون قواعدها متممة لخيط الحامض النووى القالب.

أما الإنزيم reverse transcriptase فإنه يعد RNA-dependent DNA polymerase، وهو يقوم بإنتاج خيط دنا من قالب من الرنا. ويستعمل هذا الإنزيم أساسًا فى نسخ جزيئات RNA عند تحضير الـ cDNA (وهو الـ complementary DNA، أو الـ copy DNA؛ عن Nicholl ١٩٩٤).

الإنزيمات التى تحور نهايات جزيئات الدنا

تعمل مجموعة من الإنزيمات على نهايات جزيئات الدنا، ومن أمثلتها ما يلى:

Alkaline phosphatase

Polynucleotide kinase

Terminal transferase

ومن خلال وظائف تلك الإنزيمات، فإنه يستفاد منها فى أوجه شتَّى.

وكما يستدل من الإسم، فإن إنزيمات الـ phosphatase، والـ kinase تقوم بوظيفة إزالة أو إضافة مجموعات الفوسفات. فمثلاً يقوم الإنزيم البكتيرى alkaline phosphatase بإزالة مجموعات الفوسفات من الأطراف الـ 5′ للدنا؛ تاركًا مجموعة الـ 5′-OH، ويستعمل الإنزيم فى منع الربط ligation غير المرغوب فيه لجزيئات الدنا، وهو الذى قد يتسبب فى مشكلة فى بعض إجراءات عزل الجينات.

أما الإنزيم terminal transferase فإنه يضيف – بصورة متكررة – نيكليوتيدات لأى نهاية 3′ متوفرة، وهو يستعمل أساسًا فى إضافة ذيل من الـ homopolymer لجزيئات الدنا قبل إنشاء التركيب الجديد له (عن Nicholl ١٩٩٤).

إنزيمات وصل الدنا

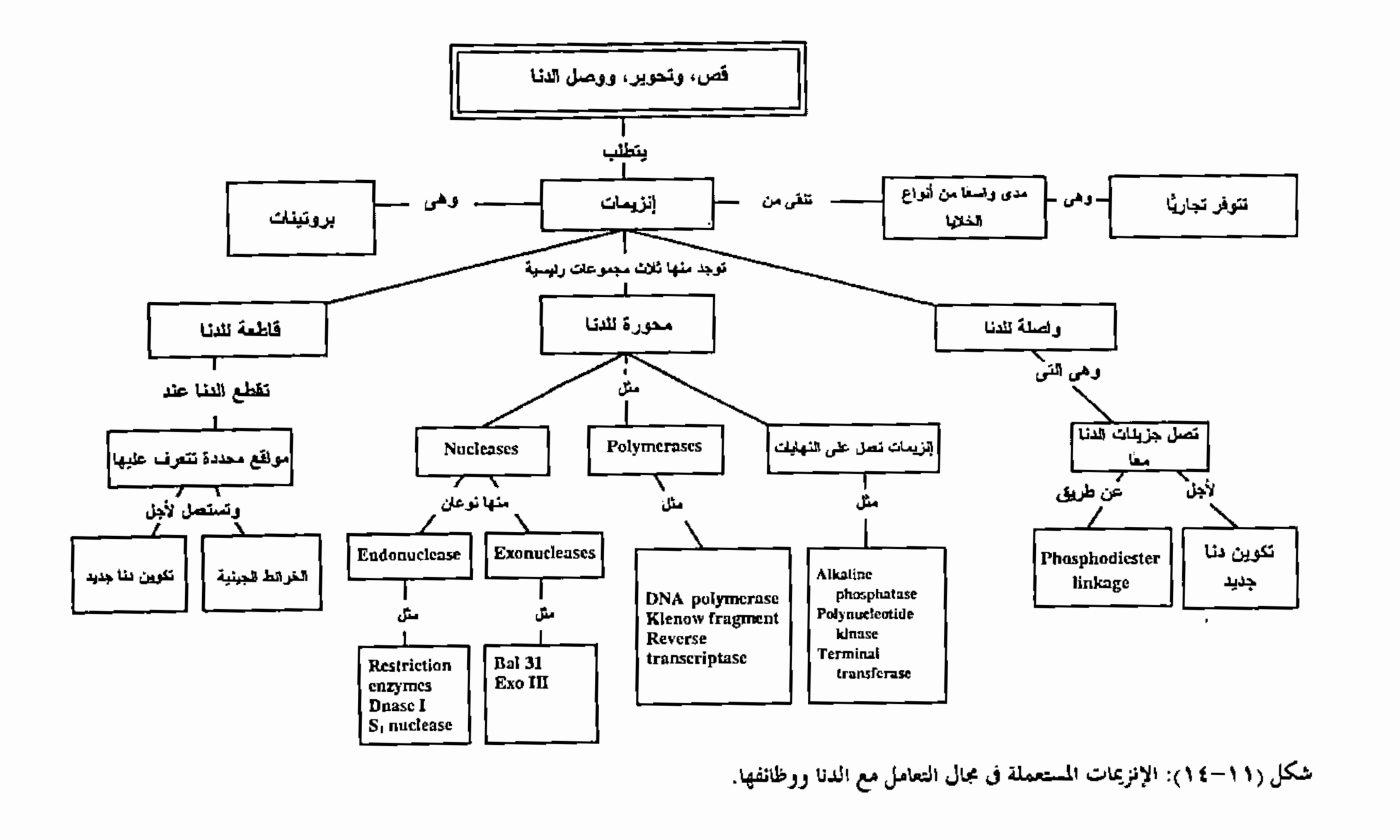
إن الإنزيمات التى تستعمل فى وصل جزيئات الدنا تعرف باسم DNA ligases وعندما يقطع كلاً من دنا الناقل vector DNA والدنا الغريب foreign DNA بالإنزيم القاطع restriction enzyme ذاته، فإن النهايتين المتطابقتين جزئيًا لكل من دنا الناقل والدنا الغريب تكونا متوافقتين ومكملتين لبعضهما البعض وعند خلط أجزاء الدنا وجزيئات الناقل معًا فإنهما يكونا أزواج متكاملة من القواعد بين التتابعات الطرفية المتطابقة جزئيًا لخيط الدنا المفرد. تعمل إنزيمات الـ ligases على الدنا ذات مجموعات الفوسفات الطرفية من النوع ′5، وتكون الرابطة الـ phosphodiester بين تتابعات كل من دنا الناقل والدنا الغريب لربطهما معًا. وتلك هى الخطوة الأخيرة فى تركيب جزئ دنا جديد recombinant DNA molecule. وتعرف تلك العملية باسم ligation (عن Chawla ٢٠٠٠)

تعد إنزيمات ربط الدنا DNA ligase من الإنزيمات الخلوية الهامة؛ إذ إنها تعمل على إصلاح الروابط الـ phosphodiester التى قد تحدث عشوائيًا، أو كنتيجة لانقسامات الدنا أو انعزالاته. وتستعمل هذه الإنزيمات فى مجال الهندسة الوراثية فى لحام حالات عدم الاستمرارية فى سلاسل الـ sugar-phosphate التى تنشأ عند تكون الدنا الجديد، وذلك بربط جزيئات دنا من مصادر مختلفة، وهى بذلك تعد بمثابة صمغ جزيئى يستعمل فى لصق قطع من الدنا مع بعضها البعض. وتعد هذه الوظيفة أساسية لنجاح عديد من الخطوات.

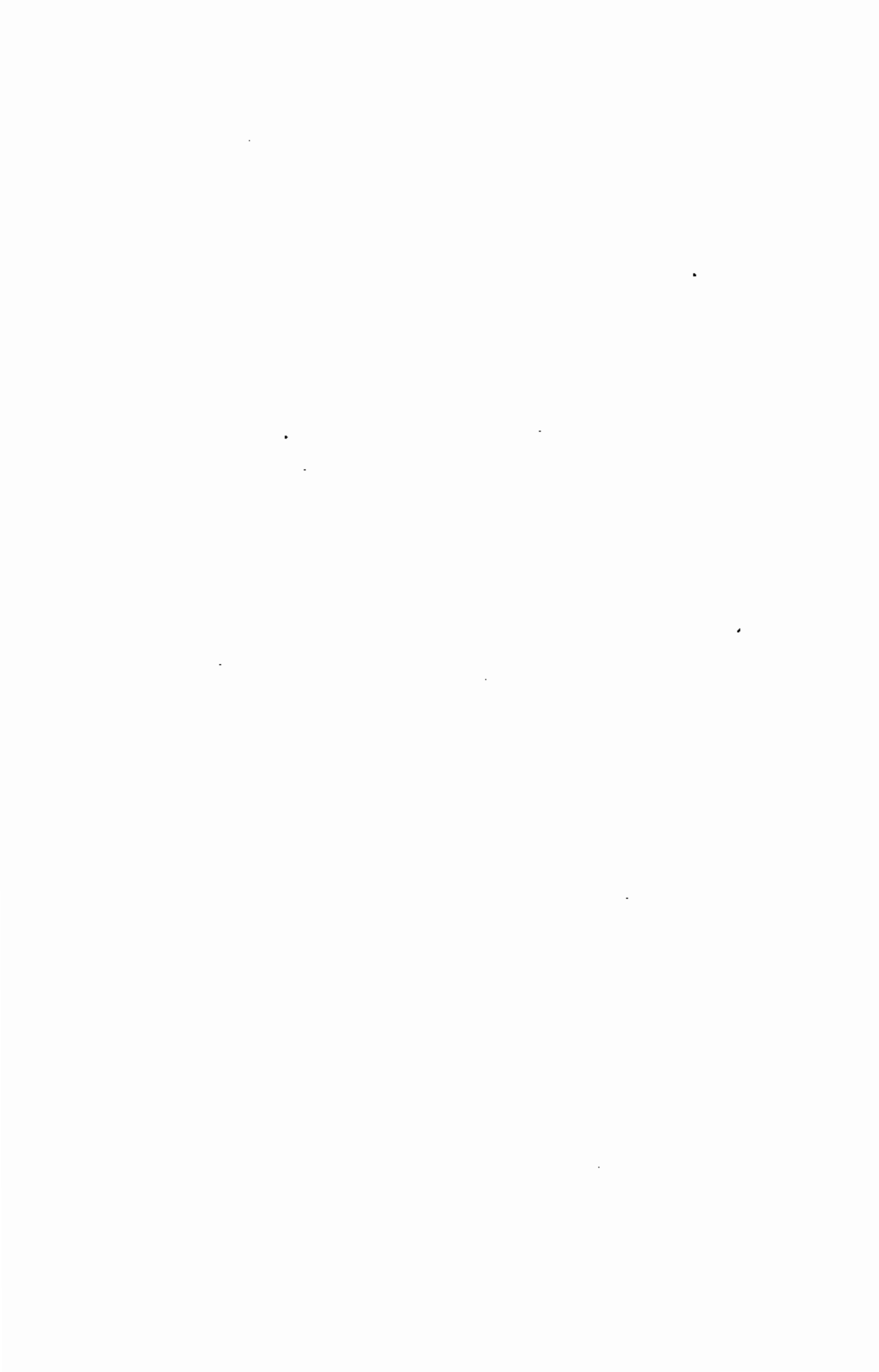
وأكثر إنزيمات الربط استعمالاً الإنزيم T4 DNA ligase. الذى يُحصل عليه من البكتيريا *E coli* المصابة بالبكتيريوفاج (الفاج البكتيرى) T4

وجدير بالذكر أن جميع عمليات قص الدنا ولصقه تتم فى أنابيب الاختبار، إلا أنه ما أن يُحصل على الدنا الجديد recombinant DNA، فإنه يتعين إكثاره حتى يتوفر لدينا قدر كافٍ منه لعمليات التداول التالية. وتجرى عملية الإكثار هذه فى كائن حىّ

هذا. ويلخص شكل (١١-١٤) الأنواع المختلفة من الإنزيمات المستعملة فى مجال التعامل مع الدنا ووظائفها (عن Nicholl ١٩٩٤)



شكل (١١–١٤): الإنزيمات المستعملة فى مجال التعامل مع الدنا ووظائفها.



الفصل الثانى عشر

طرق التحول الوراثى : الاستراتيجيات والوسائل والتحديات

تمهيد

تعتمد عملية التحول الوراثى genetic transormation على كل من الـ recombinant DNA technology (الفصل الحادى عشر)، وطرق التحول الوراثى gene transfer methods (هذا الفصل)، وتقنيات مزارع الأنسجة (الفصول الأولى من الكتاب). ولقد أنتجت نباتات محولة وراثيًا فى أعداد كبيرة جدًا من الأنواع النباتية بهدف تحسينها، فيما أصبح يعرف باسم التربية بالجين الواحد single gene breeding، والتربية بالتحول الوراثى transgenic breeding.

متطلبات التعبير الجينى والتعرف على التحول الوراثى

لقد أظهر تركيب الجينات وطريقة فعلها على المستوى الجزيئ أن الجين الذى يُراد نقله لا يتكون فقط من الجزء الكودى coding region الذى يحدد ترتيب الأحماض الأمينية فى البروتين المنتج، ولكنه يتضمن – كذلك – تتابعات أخرى فى الدنا تحدد جزء النبات الذى يتأثر بهذا الجين، ووقت ومعدل إحداثه لهذا التأثير. تتوفر تلك المعلومات فى منطقة من الجين تعرف باسم الـ promoter region يوجد ضمنها تتابعات الـ enhancer التى تحدد النسيج الذى يظهر فيه تأثير الجين، ومرحلة التكوين الذى يظهر عندها فعله.

وعادة ما تعبر الـ promoters فى الجينات المتحصل عليها من مصادر غير نباتية .. عادة ما تعبر عن ذاتها بصورة ضعيفة للغاية فى النباتات، الأمر الذى يتطلب عزل promoters مناسبة لها. ويتوفر حاليًا عدد من تلك الـ promoters، التى أفادت كثيرًا

فى تحقيق التعبير الخاص بالجينات – المتحصل عليها من مصادر غير نباتية – فى النباتات

وحتى بعد إجراء عملية التحول الوراثى فإن الخلايا أو النباتات التى يتجدد نموها يتعين تقييمها وغربلتها للتعرف على النباتات التى تحولت وراثيًا وفصلها عن تلك التى بقيت على حالها. ويعد ارتباط الجين المنقول بمعلم يسهل التعرف عليه (يعرف باسم reporter gene) أمرًا ضروريًا لزيادة كفاءة عملية التقييم والتعرف على النباتات التى تحولت وراثيًا ويعنى ذلك أن التحول الوراثى لا يقتصر على الجين المعنى فقط (الـ structural gene)، وإنما يعتمد على نقل حزمة من تتابعات الدنا تعرف باسم gene construct تشفر لكل من الـ structural gene، وتعبيره الطبيعى، ووسيلة التعرف عليه.

تقنية شفرة الرنا العكسية

إن الفكرة من وراء استخدام تقنية الشفرة العكسية للرنا antisense RNA technology هى وقف فعل الجين وتبعًا لتلك التقنية يتم إنتاج رنا صناعى ذات تتابعات نيكليوتيدية معاكسة للترتيب الطبيعى لها فى الرنا الرسول للجين المراد إيقاف فعله فى النبات وعند تواجد هذا الرنا المعكوس والتحامه – كما هو متوقع – مع الرنا العادى غير المعكوس، فإن البروتين الذى يتحكم الجين فى إنتاجه لا يتم تمثيله. هذا علمًا بأن الهجين بين الرنا المعكوس والرنا الرسول الطبيعى قد يوقف مرور الرنا الرسول إلى السيتوبلازم، أو يزيد من إنتاج الرنا، أو يتعارض مع نقل الرنا الرسول للشفرة الوراثية؛ وبذا يتوقف فعل الرنا الرسول فى النبات (عن Mount & Berman ١٩٩٤).

ويستفاد من تقنية الرنا ذات الشفرة العكسية فى أمرين هامّين، هما: منع التعبير عن الجين كما أسلفنا بيانه، والتعرف على وظائف الجينات التى لا تعرف وظائفها.

ولقد كانت أولى استخدامات تقنية الرنا ذات الشفرة العكسية إنتاج طماطم يقل فيها التعبير عن الجين الذى يشفر لإنتاج الإنزيم polygalacturonase إلى ١٠٪ من مستواه الطبيعى، وهو الإنزيم المسئول عن فقد الثمار لصلابتها بعد اكتمال نضجها وأعقب ذلك

استخدام هذه التقنية فى إنتاج نباتات مقاومة للفيروسات، وذلك بتحويلها وراثيًا بالشفرة المضادة للجين المسئول عن تكاثر الفيرس المعنى.

إن أبسط طريقة لإنتاج رنا ذات شفرة عكسية anti-sense RNA لجين ما، هى باتباع الخطوات التالية:

١ – عزل الجين المرغوب فيه.

٢ – عزل تتابعات الشفرة الخاصة بالجين عن تلك الخاصة بالـ promoter الخاصة به، باستعمال إنزيمات القصّ restriction enzymes المناسبة.

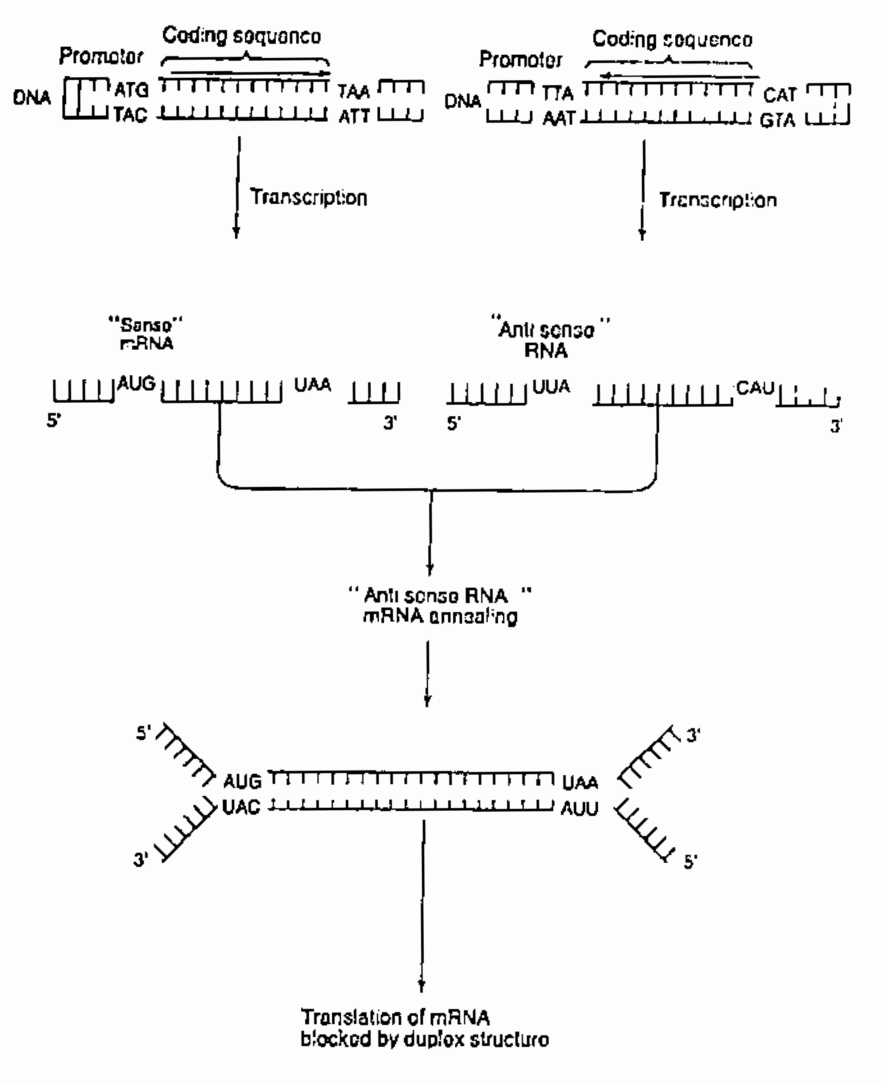
٣ – إعادة تتابعات الشفرة إلى الـ promoter الخاص بالجين فى وضع عكسى.

٤ – إدخال الـ promoter المتصل به الشفرة العكسية promoter/inverted coding sequence construct (وهو الجين ذات الشفرة العكسية antisense gene) فى خلية العائل أو الكائن الحىّ بطريق التحول الوراثى.

تكون نتيجة ذلك أن نسخ الـ promoter/inverted coding sequence يؤدى إلى إنتاج رنا ذات شفرة مضادة anti-sense RNA، تقوم بدورها بالتهجين بالرنا العادى sense RNA فى الخلايا (حيث يتكون خيط مزدوج للرنا RNA double helices)، ومن ثم تمنع ترجمة الرنا الرسول mRNAs (شكل ١٢–١). وتكون النتيجة النهائية لكل ذلك هى إما عدم تمثيل البروتين الخاص بالجين المعنى كلية، وإما تمثيله بكميات قليلة جدًا فى الخلايا المحتوية على الرنا ذات الشفرة المضادة. ولكى يكون وقف تمثيل البروتين الخاص بالجين تامًا يجب إما استعمال promoter قوى للغاية لكى يوجه عملية الاستنساخ فى تتابعات الشفرة المقلوبة، وإما التحويل الوراثى بعدة نسخ من الجين ذات الشفرة العكسية (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).

طرق واستراتيجيات التحول الوراثى .. نظرة عامة

تعرف طريقتان رئيسيتان لنقل الجينات، هما: (١) بالاعتماد على ناقل vector-mediated، و(٢) النقل المباشر للجينات direct gene transfer، وتندرج تحت كل طريقة منها عدة وسائل، كما يلى:



شكل (١٢-١): تقنية الشفرة المعكوسة للرنا.

أولاً: الطرق التي تعتمد على ناقل vector

إن أكثر أنواع الناقلات vectors استعمالاً، ما يلي:

أولاً: عندما يكون العائل خلايا نباتية:

١ - ناقل بلازميدى، وفيه الحامض النووى دنا، ومن أمثلته الـ Ti plasmid الخاص بالبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*، وكذلك *A. rhizogens*.

٢ – ناقل فيروسي .. وفيه قد يكون الحامض النووى دنا، كما فى فيرس موزايك القنبيط، أو من الرنا، كما فى فيرس موزايك التبغ.

ثانيًا: عندما يكون العائل خلايا حيوانية:

١ – ناقل بلازميدى، وفيه الحامض النووى دنا، ويتوفر من تلك الناقلات عدة أنواع، الكثير منها هجن تحتوى على الجينوم SV40.

٢ – ناقل فيروسي، وفيه قد يكون الحامض النووى دنا، كما فى كل مما يلى:

Baculoviruses

Papilloma viruses

Simian virus 40(SV40)

Vaccinia virus

وقد يكون الحامض النووى رنا، كما فى الـ Retroviruses.

٣ – ناقل transposon، وفيه الحامض النووى دنا كما فى عناصر P (أو الـ P elements) فى الـ *Drosophila melanogaster*.

تستعمل الناقلات البلازميدية plasmid vectors فى عمليات التحول الوراثى لنقل الدنا الجديد أو الجينات الجديدة إلى العوائل، وتتوفر أنواع كثيرة من هذه البلازميدات فى الطبيعة، وجميعها جزيئات دنا حلقية وصغيرة نسبيًّا. وعلى الرغم من أن تلك البلازميدات ليست حتمية لبقاء الكائن وانقسامه، فإنها تحتوى – غالبًا – على صفات قد تكسب الكائن ميزة انتخابية، مثل صفة المقاومة للمضادات الحيوية، وهى التى تستعمل – غالبًا – فى إنشاء الـ vectors فى دراسات الهندسة الوراثية، حيث توفر وسيلة مناسبة لانتخاب الخلايا المحتوية على البلازميد.

وقد تستخدم vectors عبارة عن فاجات بكتيرية bacteriophages للاستعمال مع البكتيريا، مثل *E. coli*، وهى على أنواع كثيرة (عن Nicholl ١٩٩٤).

وترتبط التحولات الوراثية التى تجرى بواسطة الناقلات vectors – بشدة – بقدرة النبات العائل على تجديد نفسه (تعتمد على الـ regeneration capabilities للنبات

المراد تحويله وراثيًّا). وتتضمن الأجزاء النباتية explants التى تكون مستهدفة فى عملية التحول الوراثى باستعمال الناقلات كلا من البروتوبلاستات، والخلايا المعلقة، وتكتلات خلايا الكالس، وطبقات الخلايا، وشرائح الأنسجة، وحتى أجزاء من الأعضاء الكاملة. ويجب أن تكون الخلايا المستعملة فى التحول الوراثى قادرة على الدخول فى عملية انقسام الدنا، وهى التى تتوفر فى الخلايا المجروحة أو التى تعاود تميزها، أو البروتوبلاستات

ثانيًا: طرق النقل المباشر للجينات

إن من أهم طرق النقل المباشر للجينات Direct Gene Transfer ، ما يلى

Physico-chemical uptake of DNA

Liposome encapsulation

Electroporation of protoplasts

Microinjection

DNA injection into intact plants

Incubation of seeds with DNA

Pellen tube pathway

Laser microbeam

Electroporation into tissues/embryos

Silicon carbide fiber

Particle bombardment

منطلبات نجاح عملية التحول الوراثى

يتطلب نجاح إجراء عملية التحول الوراثى توفر الـ gene construct المناسب، ونقله إلى الخلايا النباتية، وظهور فعله، وتحديد النباتات التى تحولت وراثيًا

ويجب أن تتوفر فى طريقة التحول الوراثى المثلى لأى محصول الشروط التالية:

١ – أن يكون بالاستطاعة الحصول على أعداد كبيرة من النباتات المحولة وراثيًا، لأجل تقدير المستويات المفيدة للتعبير الجينى، ولأجل تقييم تأثير ظاهرة التأثير الموضعى position effect على التعبير الجينى.

٢ – سرعة الحصول على النباتات المحولة وراثيًا (أى سرعة تجديد نموها من المزارع)، لأجل تقليل التأثيرات غير المرغوب فيها لتباينات المزارع فى تلك التى تبقى لفترة طويلة قبل تجديد النمو منها، أو منع تلك التأثيرات كلية.

٣ – أن تكون طريقة التحول الوراثى صالحة لأى تركيب وراثى، لأجل استخدامها فى نقل الصفات الهامة إلى أى صنف مرغوب فيه (عن Christou ١٩٩٤)

ولقد أدى تطبيق تقنيات الدنا إلى التوسع فى القاعدة الوراثية للأنواع النباتية، نظرا لأن الجينات المنقولة قد تأتى من أنواع نباتية بعيدة كل البعد عن الأنواع المعنية، أو من فيروسات، أو بكتيريا، أو فطريات، أو حشرات، أو حيوانات أو من الإنسان، أو حتى من عمليات التخليق الكيميائى فى المختبر.

التربية بالتحول الوراثى

نظرًا لأن النباتات المحولة وراثيًا غالبًا ما تحتوى على عديد من نسخ الجين المنقول فى مواضع مختلفة من الهيئة الكروموسومية للنبات المحول – الأمر الذى قد يؤثر على الشكل المظهرى للنبات الناتج – فإنه قد يكون من المرغوب فيه إجراء عملية التحويل الوراثى على سلالات لم تصل بعد إلى نهاية برنامج التربية، وذلك لإتاحة الفرصة لحدوث الانعزالات المرغوب فيها فى نسخ الجين المنقول فيما تبقى من أجيال فى برنامج التربية وعلى الرغم من ذلك . فإن عمليات التحول الوراثى تجرى غالبًا على صفوة السلالات التى تنتج من برامج التربية (عن Block ١٩٩٣).

إن أهم جوانب التربية بالتحول الوراثى transgenic breeding، ما يلى:

١ – تقييم الجين المنقول:

يعد تقييم الجين المنقول transgene evaluation من أهم جوانب التربية بالتحول

الوراثى، ويمكن أن تتم تلك العملية على مستوى النبات الـ hemizygous، إلاّ أنها تؤخّر – غالبًا – لحين الوصول إلى حالة الأصالة الوراثية homozygosity، كما قد يجرى التقييم على المستوى الجزيئى، أو على مستوى الصفات المرغوب فيها. وعند وجود ارتباط قوى بين التعبير على المستوى الجزيئى ومستوى الصفات، فإن التقييم على المستوى الجزيئى يمكن أن يعطى نتائج سريعة، ويمكِّن المربى من إجراء عملية الانتخاب فى المراحل المبكرة. هذا إلاّ أن مثل هذا الارتباط البسيط قد لا يتوفر فى حالات كثيرة.

٢ – الانتخاب للجين المنقول

يعد الانتخاب للجين المنقول transgene selection ضروريًّا لتطوير الصفة المحولة وراثيًا، ولعل أهم عملية انتخاب هى تلك التى يتبين فيها ما إذا كانت النباتات التى أخضعت لعملية التحول الوراثى قد تلقت الجين المرغوب فيه، أم لا.

يلى ذلك انتخاب النباتات المحولة وراثيًّا التى تظهر فيها وراثة مندلية للصفة لا تتأثر بالخلفية الوراثية للنبات أو بالعوامل البيئية، ولا تؤثر فيها الصفة المنقولة سلبيًّا على الصفات الأخرى الأصلية بالنبات (عن Zhong ٢٠٠١).

وبعد إنتاج النباتات المعدلة وراثيًّا مباشرة فإنها تُقيَّم أولاً معمليًا وفى حجرات النمو وفى الصوبات الآمنة – المعزولة جيدًا عما يوجد بخارجها – لتحديد طبيعة التعبير للجينات المنقولة، وما إذا كان الشكل المظهرى للنبات المحول وراثيًا فى الاتجاه المرغوب فيه أم لا. تقترن تلك الاختبارات – فى الوقت ذاته – بتحليل جزيئى لتحديد عدد نسخ الجين التى نقلت بالفعل، ومدى سلامة وكمال الدنا المنقول. تنتخب – عادة – النباتات التى يثبت تلقيها لنسخة واحدة من الجين المنقول حتى يكون السلوك الوراثى لهذا الجين فى الأجيال التالية بسيطًا ومن الممكن التنبؤ به، كما يسمح ذلك بتجنب أى احتمال لحدوث تفاعلات بين النسخ المختلفة للجين المنقول إلى نفس النبات (عن Dale & Irwin ١٩٩٥).

التحول الوراثى عن طريق بكتيريا الأجروباكتيريم

تعد الأجروباكتيريم *Agrobacterium* من بكتيريا التربة السالبة لصبغة جرام، وهى

تتواجد بصورة طبيعية، ويعرف منها نوعان رئيسيان، هما: *Agrobacterium tumefaciens*، و *A. rhizogenes*، اللذان يعرفان باسم "المهندسون الوراثيون الطبيعيون" natural genetic engineers، نظرًا لقدرتهما على تحويل النباتات وراثيًّا.

ونجد فى بيئتها الطبيعية أن *A. tumefacines* تسبب مرض التثألل التاجى crown gall. وتوجد فى الكروموسوم البكتيرى جينات تتحكم فى تعرف البكتيريا على الخلايا القابلة للإصابة فى العائل، وفى الارتباط بتلك الخلايا. هذا .. إلاّ أن قدرة البكتيريا على نقل الدنا الخاص بها - والذى يدمج فى كروموسوم النبات (عملية التحول الوراثى) - والمقاومة للمضادات الحيوية، والقدرة على الإصابة pathogenicity - كل تلك الصفات يُشفَّر لها على بلازميد plasmid خاص فى البكتيريا.

ويعد البلازميد قطعة من الدنا تكون مستقلة عن الكروموسوم البكتيرى، ويمكنها الانقسام مستقلة عنه. ويعد بلازميد الطراز البرى للـ *A. tumefacines* هو المسئول عن إحداث التورمات فى النبات العائل، ولذا .. فإنه يعرف باسم tuber inducing (Ti) plasmids.

وعندما تُصيب البكتيريا *A. rhizogenes* النباتات فإنه يتكون بها جذورًا عرضية بكثافة عالية عند موضع الإصابة، الأمر الذى ينظمه الـ Ri plasmid (Ri نسبة إلى root inducing). ولقد طورت نواقل vectors، مثل pRiAu تحتوى على الـ *Ri plasmid*. وتعد الـ Ri vectors مفيدة - خاصة - لدراسة تكوين عقد الرايزوبيم الجذرية، ولأجل الحصول على منتجات الأيض الثانوية من مزارع الجذور، وكذلك فى إنتاج الميكوريزا (الـ Vasicular Arbuscular Mycorrhiza، عن Chahal Gosal ٢٠٠٢).

وكما أسلفنا .. فإن قدرة بكتيريا الـ *A. tumefaciens* على الإصابة وإحداث التثألل تعتمد على وجود بلازميد plasmid كبير بالبكتيريا مسئول عن إحداث التثألل يأخذ الاسم Ti plasmid (من tuber-inducing plasmid). وتوجد بهذا البلازميد قطعة من الدنا محددة بـ 25bp من الـ imperfect direct repeats (أو T-DNA من transfer DNA) هى التى تنتقل إلى النبات. ولا تلزم الجينات التى تقع على الـ T-DNA لانتقاله واندماجه مع دنا النبات الذى ينتقل إليه، ولكنها تلزم لتمثيل حامض أمينى ومشتقات

سكرية له تعرف باسم opines، تستعملها البكتيريا كغذاء لها. كما يوجد بالـ T-DNA جينات مسئولة عن تمثيل الأوكسينات والسيتوكينينات أو تعديلها. يؤدى تمثيل هذه الهرمونات النباتية إلى إحداث نمو جديد فى النبات يقود إلى ظهور أعراض التثألل التاجى. هذا . ويمكن فصل الجينات المسئولة عن تمثيل الهرمونات النباتية والـ opines من الـ T-DNA واستبدالها بجينات جديدة يُرغب فى نقلها وراثيًا، الأمر الذى تحقق بكفاءة عالية فى كثير من الأنواع النباتية، مثل التبغ، والطماطم، والأرز، والذرة، والبيتونيا، والـ *Arabidopsis* (عن Coury & Feldmann ١٩٩٨).

مدى عوائل الأجروبكتيريم

استمر الاعتماد على البكتيريا *A. tumefaciens* لفترة طويلة كطريقة مفضلة لإجراء التحولات الوراثية فى ذوات الفلقتين، التى يعرف جيدًا كيفية تجديد نموها النباتى من مزارع الأنسجة. ويتضمن مدى العوائل لهذه البكتيريا حوالى ٦٠٪ من معراة البذور، وكل ذوات الفلقتين من مغطاة البذور. كذلك أمكن تحقيق التحول الوراثى باستعمال الأجروباكتيريم بنجاح فى بعض أنواع ذوات الفلقة الواحدة، مثل الأسبرجس *Asparagus officinalis*، والنرجس narcissus، واليام *Discoria bulbifera* وقد أفاد فى هذا الشأن معاملة الأجروبكتيريم المستعملة بإفرازات الجروح (وهى مركبات فينولية) من درنات البطاطس، أو ببعض المركبات الفينولية المخلقة معمليًا مثل الـ acetosyringone إما أثناء النمو البكتيرى، وإما أثناء زراعتها المشتركة مع النسيج المراد تحويله وراثيًا. كذلك أمكن تحويل الأرز وراثيًا باستعمال الأجروباكتيريم، وطبقت الطريقة التى استخدمت معه فى عمليات تحول وراثى ناجحة فى كل من الشعير، والقمح، والذرة، وقصب السكر (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

لا تعد غالبية النباتات الوحيدة الفلقة من العوائل الطبيعية للأجروباكتيريم المستخدمة فى عمليات التحول الوراثى؛ فلم تثبت القابلية للإصابة بالبكتيريا – فى غير ذوات الفلقتين - سوى فى الأنواع التابعة للرتبتين: Liliales، و Arales. وبالمقارنة ثبتت المقاومة للبكتيريا فى جميع النباتات التى اختبرت من رتبة Poales، إلا أن بعض

النباتات الوحيدة الفلقة التى تستعصى إصابتها بالبكتيريا يمكن – تحت ظروف خاصة – تحويلها وراثيًا بالأجروباكتيريم (عن Jahne وآخرين ١٩٩٥).

وكما سبق أن أوضحنا .. فقد ثبت إمكان نقل الـ T-DNA من الأجروباكتيريم إلى الخلايا النباتية لعديد من وحيدات الفلقة الهامة، مثل الذرة، والأرز، والقمح. ولقد وجد فى الذرة أن النبات ينتج مركب أيض ثانوى ذات فعل بكتيرى مثبط يمنع حث الـ vir genes، إلا أن هذا المركب ليس ثابتًا، حيث أدت فترة من الزراعة فى مزارع الأنسجة قبل التلقيح بالبكتيريا، أو إطالة فترة مزرعة الأنسجة مع البكتيريا إلى التغلب على هذا التأثير المثبط.

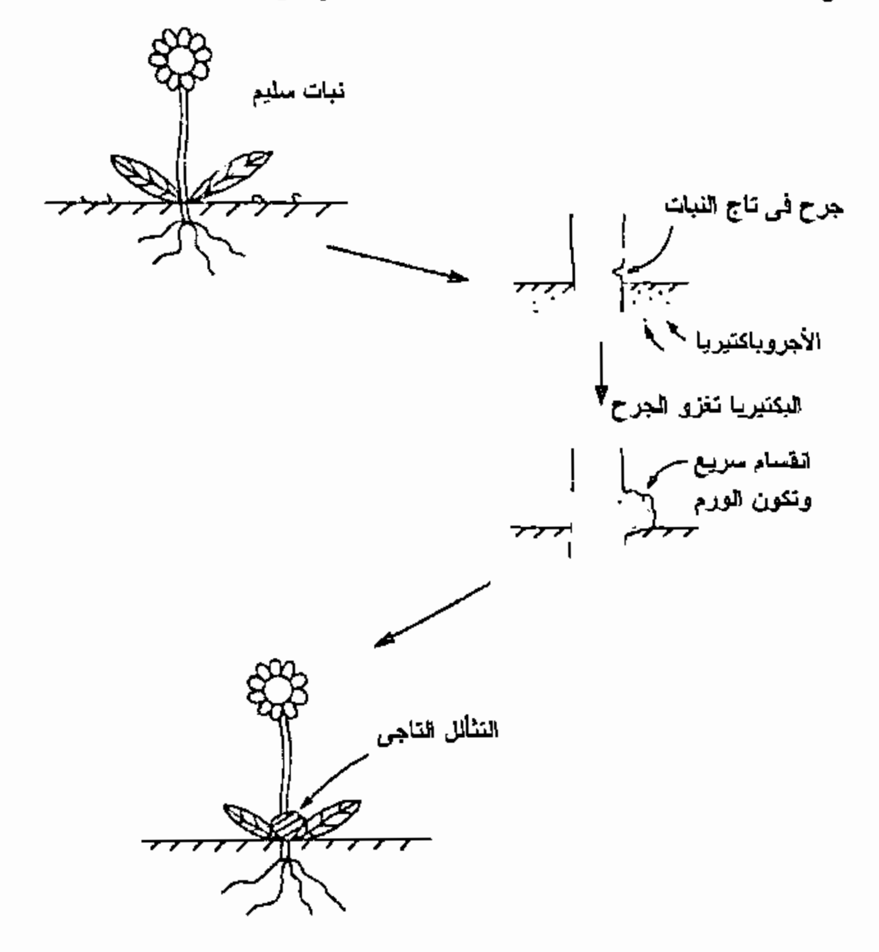
هذا وتنتج سلالات الأجروباكتيريم المختلفة آليات خاصة من الـ vir A gene، يمكن لبعضها أن يشفر لبروتين vir A غير حساس للمركب الأيضى الثانوى الذى تطلقه النباتات الأحادية الفلقة. ولذا فإنه من الضرورى فى عمليات التحول الوراثى للنباتات الأحادية الفلقة استعمال سلالة أجروباكتيريم تحتوى على جين vir A متوافق معها (عن Block ١٩٩٣).

كذلك أمكن زيادة كفاءة التحويلات الوراثية المعتمدة على بكتيريا الأجروباكتيريم، والتغلب على مشكلة عدم قدرة البكتيريا على إصابة عوائل معينة باللجوء إلى الترددات الصوتية العالية sonication. وفى هذه الطريقة يُعَرَّض النسيج النباتى المستهدف لفترات قصيرة من الموجات الصوتية الفائقة ultrasound فى وجود الأجروباكتيرم. ولقد أمكن بهذه الطريقة الحصول على تحويلات وراثية ثابتة فى فول الصويا. وأوضح التحليل الهستولوجى أن المعاملة أحدثت فى النسيج النباتى تشققات دقيقة ومتجانسة وقنوات، وهى التى ربما تكون قد ساعدت فى تسهيل الإصابة بالبكتيريا (عن Simmond & Smartt ١٩٩٩).

باثولوجى الإصابة بالأجروباكتيريم

عندما تحدث الجروح فى منطقة تاج النبات – أو فى أى مكان آخر منه – فإنه يمكن أن تحدث العدوى بالبكتيريا *A. tumefaciens* بسهولة، حيث تبدأ الخلايا النباتية فى

مكان الإصابة فى الانقسام والتضخم لتكون ورمًا tumor، أو ما يعرف بالتثألل التاجى (شكل ١٢-٢)، ثم تبدأ فى تمثيل مشتق من الأرجنين يطلق عليه اسم أوبين opine، يكون – عادة -- إما نوبالين nopaline، وإما أوكتابين octapine، الأمر الذى يتوقف على سلالة الأجروباكتيريم المستعملة فى العدوى تستخدم هذه الأوبينات كمصادر للطاقة بواسطة البكتيريا وجدير بالذكر أن سلالات بكتيريا الأجروباكتيريم التى تستحث تمثيل النوبالين يمكنها النمو على النوبالين وليس الأوكتابين، والعكس بالعكس. وبينما توجه البكتيريا أيض النبات لإنتاج الأوبينات التى تستفيد منها كمصدر للطاقة، فإن تلك المركبات ليست لها فائدة للنبات (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).



شكل (١٢-٢) كيفية ظهور أعراض التثألل التاجى **crown gall**.

ويعطى جدول (١٢-١) أمثلة لعدد من طرز opines من كل من الـ Ti plasmids والـ Ri plasmids (عن Grant وآخرين ١٩٩١).

جدول (١٢-١): أمثلة لعدد من طرز الـ opines من الـ Ti plasmids، والـ Ri plasmids.

طراز opine	نوعيات الـ Opines	أمثلة لسلالات الأجروباكتيريم
Tiplasmids		
Octopine	Octopine, octopinic acid, lysopine, histopine, agropine, agropinic acid. Mannopine, mannopinic acid	B6, ACH5
Nopaline	Nopaline, nopalinic acid, agrocinopine A	C58, T37
Agropine	Agropine, agropinic acid, mannopine, mannopinic acid, agrocinopine C	AT1, AT4
Succinamopine	Succinamopine, succinamopine lactam, succinopine lactam	Eu6, 181
Grapevine	Octopine, cucumopine	K305, K308
Ri plasmids		
Agropine	Agropine, agropinic acid, mannopine, mannopinic acid, agrocinopine A	A4, TR105
Mannopine	Mannopine, mannopinic acid, agrocinopine C, agropinic acid	TR7, 8196
Cucumopine	Cucumopine	2655, 2657

بلازميد الأجروباكتيريم: تركيبه ودوره فى إحداث النمو السرطانى

إن قدرة البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* على إحداث النمو السرطانى فى النباتات التى تصيبها مرده إلى ما يعرف بالـ Ti plasmid (أو الـ tumer inducing plasmid) البكتيرى، وهو بلازميد كبير يحتوى على أكثر من ٢٠٠٠٠٠ زوج من النيكليوتيدات (يزيد طوله عن ٢٠٠ kb ويحمل عديدًا من الجينات ذات العلاقة بعملية الإصابة، (شكل ١٢-٣أ). ومن أبرز خصائص هذا البلازميد أن جزءًا منه يندمج - بعد الإصابة - فى الدنا الكروموسومى للنبات (شكل ١٢-٣ب). ويتراوح حجم هذا الجزء

الذى يطلق عليه اسم T-DNA – بين ١٥، و ٣٠ kb، حسب السلاله البكتيرية يتبقى هذا الجزء ثابتًا فى الخلية النباتية ويمر أثناء انقساماتها كجزء أساسى من كروموسوماتها ومن الخصائص البارزة لهذا الـ Ti plasmid أن الـ T-DNA يحتوى على نحو ٨ جينات تعبر عن ذاتها فى الخلية النباتية التى انتقلت إليها. وهى التى تكون مسئولة عن الخصائص السرطانية للخلايا المحولة وراثيًا. كما أن تلك الجينات توجه النبات إلى تمثيل مركبات غير عادية، يطلق عليها اسم أوبينات opines تستخدمها البكتيريا كمغذيات لها (شكل ١٢-٣جـ) وباختصار فإن *A. tumefaciens* تحول خلايا النبات وراثيًا لأغراضها الخاصة (Brown ١٩٨٦)

يحتوى الـ Ti plasmid على منطقتين رئيسيتين لهما أهمية فى عملية التحول الوراثى، هما الـ T-DNA، و vir تعد منطقة الـ T-DNA من الـ Ti plasmid الخاص بالأجروباكتيريم هى الجزء الذى ينتقل إلى الخلية النباتية ويندمج فى جينوم النواة بالخلايا التى توجد فى جرح مصاب يحمل هذا الـ Ti plasmid الجينات التى تنتج التآليل من خلال تنظيمها للهرمونات النباتية، وهى التى يترتب على زيادة إنتاجها فى موقع لإصابة تكاثر الخلايا بشدة فى الخلايا المجروحة لتكون ورمًا يأوى الخلايا لبكتيريه

تحاط منطقة الـ T-DNA بخمسة وعشرين زوجًا من النيكليوتيدات غير المكتملة التماثل، وهى التى يلزم تواجدها فى حالة cis لاستئصال الـ T-DNA ودمجه فى الهيئة الكروموسومية للنبات ويؤدى فقد أى من التتابعات الحدودية إلى وقف التحول الوراثى للـ T-DNA إلى الخلايا النباتية كلية

ونجد فى حالة الـ Ti-plasmids التى تستحث إنتاج النوبالين أن الـ T-DNA يتكون من ٢٣٠٠٠ زوج من النيكليوتيدات التى تحمل ١٣ جينا أما فى حالة الـ Ti-plasmids التى تستحث إنتاج الأوكتابين فإنه توجد قطعتان منفصلتان من الـ T-DNA

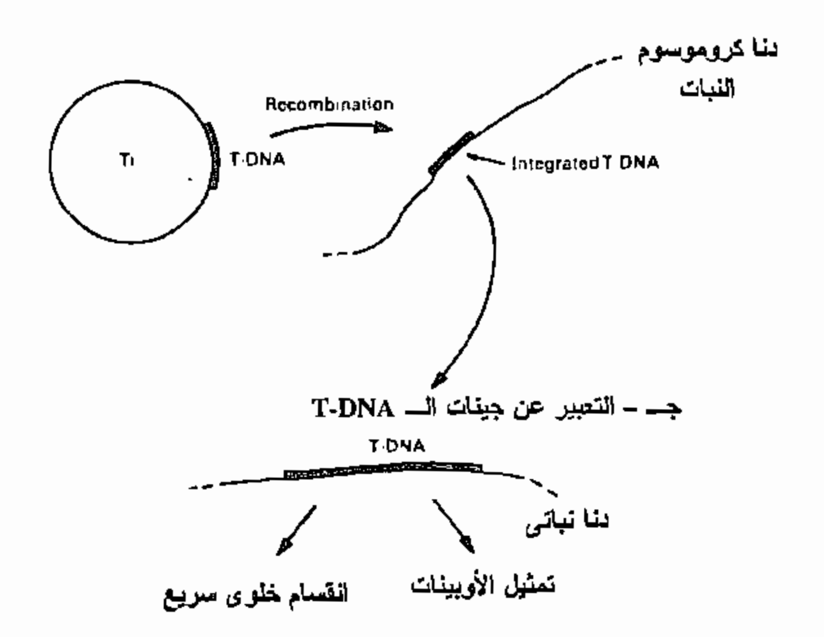
هذا ومن بين الجينات التى يحتويها الـ T-DNA جينات خاصة بتمثيل الهرمونات النباتية مثل الأوكسين. إندول حامض الخليك، والسيتوكينين

isopententenyladenosine، وهما المسئولان عن النمو السرطاني للخلايا في منطقة الإصابة.

أ - Ti plasmid



ب - اندماج الـ T-DNA في جينوم النبات



شكل (١٢-٣): الـ Ti plasmid واندماجه في الدنا الكروموسومي للنبات الذي يصاب بالبكتيريا *Agrolacterium tumefaciens*.

أما الـ vir region (نسبة إلى منطقة الضراوة أو القدرة على إحداث الإصابة virulence) في الـ Ti-plasmid فإنها تحتوى على المورثات المسئولة عن التشفير لتكوين الإنزيمات التى تلزم لعمليات استئصال، ونقل، ودمج قطعة الـ T-DNA ويمكن لهذه الـ vir genes أن توفر الوظائف التى تلزم لنقل T-DNA، وذلك حينما تقع فى حالة cis أو trans بالنسبة للـ T-DNA ولقد سهل ذلك الأمر بناء ما يعرف باسم bipartite Ti vectors تُحمَل فيها الـ T-DNA segment فى بلازميدة، بينما تُحمَّل الـ vir genes فى بلازميدة أخرى ويعرف البلازميد الذى يحتوى على الـ T-DNA segment دون أى vir genes باسم البلازميد الثنائى binary Ti vector وأهم ما يميز ذلك البلازميد مداة الأوسع من العوائل وحجمه الصغير، الأمر الذى يسهل أمورا كثيرة.

وبينما لا تعبر الـ vir genes عن ذاتها إلاّ بمستوى منخفض للغاية فى البكتيريا الحرة (فى التربة)، فإن تعرض البكتيريا للخلايا النباتية أو لإفرازاتها يجعل تلك الجينات تنشط كثيرًا، ولكنها لا تصل إلى ذروة نشاطها قبل مضى ١٠–١٥ ساعة من تعرضها للخلايا النباتية أو إفرازاتها وقد أمكن فصل المركب acetosyringone، وهو مركب فينولى تبين أنه يعمل على تنشيط فعل الـ vir operons وبذا فإن عملية الحث هذه يمكن الآن دراستها فى البيئة الصناعية باستعمال هذا المركب وأمثاله من المركبات الفينولية ذات التأثير المماثل (عن Gardner وآخرين ١٩٩١)

هذا وإذا ما أزيلت الجينات المسئولة عن ظهور أعراض المرض (المنتجة للهرمونات النباتية) من منطقة الـ T-DNA بالبلازميد (فيما يعرف بنزع سلاح البلازميد plasmid disarmament) فإن البكتيريا لا تسبب المرض وفى المقابل فإنه إذا ما وضع جين آخر فى منطقة الـ T-DNA، فإنه ينتقل إلى النبات. وعلى هذا الأساس يتم تركيب Ti plasmids تخلو من الجينات المسئولة عن حث تكوين الورم، ولكنها تحتوى على الجين المراد نقله وجين آخر معلم يرتبط به بشدة، مثل جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية.

بلازميد الأجروباكتيريم: إعداده وتجهيزه لعمليات التحول الوراثى

لقد أوضحت عديد من الدراسات أن أى دنا أولج فى أى موقع بين التتابعات الحدودية للـ T-DNA ينتقل معه إلى الخلايا النباتية ويندمج فى كروموسومات النبات

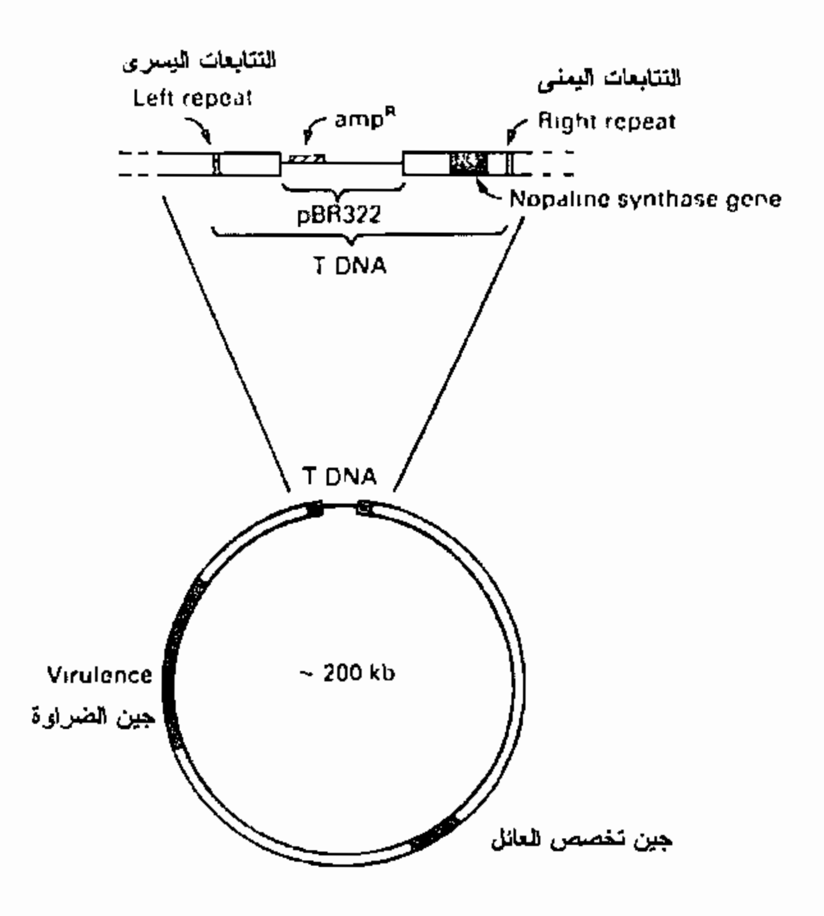
ضمن بقية الـ T-DNA. وقد كانت المشكلة أن الخلايا النباتية المحولة وراثيًا والتى تلقت الـ T-DNA من Ti-plasmid تفقد تحكمها الطبيعى فى الانقسام الخلوى؛ لتكون أورامًا، مما يجعلها غير مناسبة لعمليات التحول الوراثى.

وقد أمكن التوصل إلى حل لتلك المشكلة مبكرًا بالتعرف على جينات الـ T-DNA المسئولة عن تكوين الأورام، ووجد أن التخلص من أحد تلك الجينات أو بعضها يؤدى إلى إنتاج ما يعرف باسم moncogenic plasmid، وهو plasmid منزوع السلاح disarmed Ti plasmid (شكل (١٢-٤). وفى مقابل تلك الميزة، فإن وقف خاصية قدرة الـ Ti plasmid على تكوين الورم يجعل من الصعب جدًا التعرف على الخلايا التى تحولت وراثيًا بتلقى الـ disarmed Ti plasmid واندماجه فى هيئتها الكروموسومية. ولذا .. فقد تطلب الأمر الاعتماد على جين مُعلم خاص يولج ضمن منطقة الـ T-DNA فى الـ Ti plasmid المنزوع السلاح (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).

وبذا .. فإن الخطوة الأولى فى عملية التحول الوراثى بالاستعانة بالبكتيريا *A. tumefaciens* هى التعامل مع الدنا البكتيرى على المستوى الجزيئى؛ إذ يحتوى البلازميد plasmid البكتيرى على نحو ٧ جينات هى التى تُحدث النمو السرطانى بالنبات، وهى التى يتعين التخلص منها وإحلال الجينات المرغوب فيها مكانها. تتواجد هذه الجينات على الـ Ti plasmid على صورة خيط مستمر من الدنا مطوق من الجانبين الأيمن RB والأيسر LB بحدود واضحة. ويمكن استخدام إنزيمات القطع restriction enzymes فى التخلص من تلك الجينات، ولكن مع الحرص التام على ترك الطوقين الأيمن والأيسر كاملين، إذا إنهما ضروريين لنقل الدنا إلى النبات المرغوب فى تحويله وراثيًا.

ويلى ذلك إدخال الجين المرغوب فيه بعد تجهيزه بمنطقة تنظيمية regulatory region مناسبة، وجين لقاومة أحد المضادات الحيوية مزود - هو الآخر - بمنطقة تنظيمية خاصة به. يسمح ناتج جين المقاومة للمضاد الحيوى - والذى يكون عادة إنزيمًا مثبطًا لنشاط هذا المثبط احيوى - يسمح للخلايا التى تحتوى على هذا الجين (والتى تكون قد حولت وراثيًا) بالبقاء على بيئة زراعة تحتوى على المضاد الحيوى بتعين

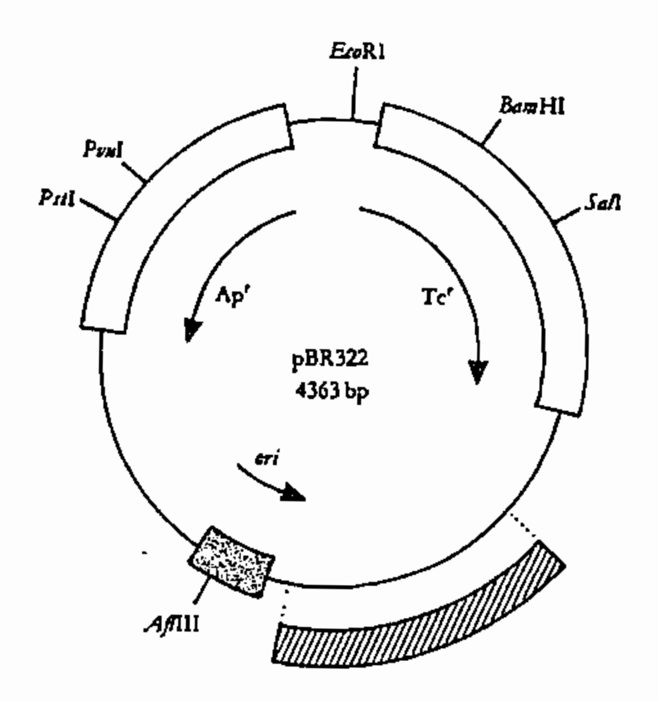
بعد ذلك إدخال هذا الـ Ti plasmid الذى تم إعداده فى سلالة مناسبة من البكتيريا *A. tumefaciens* (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).



شكل (١٢-٤): الناقل منزوع السلاح **pGV3850**. تظل تتابعات طرفا الناقل المحيطة بالـــ **T-DNA** قادرة على نقل الـــ **T-DNA** إلى الكروموسوم النباتى على الرغم من التخلص من كل الجينات غير المرغوب فيها (الـــ **oncogenes**) وإحلالها بدلا الـــ ***p*****BR322**.

ومن أكثر بلازميدات الأجروباكتيريم المجهزة استخدامًا فى عمليات التحول الوراثى البلازميدين *p*BR322 (شكل ١٢-٥)، و *p*AT153. يتميز البلازميد pBR322 باحتوائه على جينات لمقاومة الأمبسيلين (Ap^r) والتتراسيكلين Tc^r وجين بداية أو أصل origin الانقسام (ori)، كما يظهر بشكل (١٢-٥) مواقع لبعض جينات القطع الهامة.

ومن سلاسل النواقل البلازميدية التى لاقت قبولاً كبيرًا عائلة الـ pUC. تحتوى تلك البلازميدات على منطقة بها عديد من مواقع جينات إنزيمات القص restriction endonuclease sites فى جزء قصير من الدنا، ويعرف ذلك الجزء باسم polylinker أو multiple cloning site (اختصارًا: MCS). وتظهر خريطة لأحد نواقل الـ *p*UC (الناقل *p*UC18) فى شكل (١٢-٦).

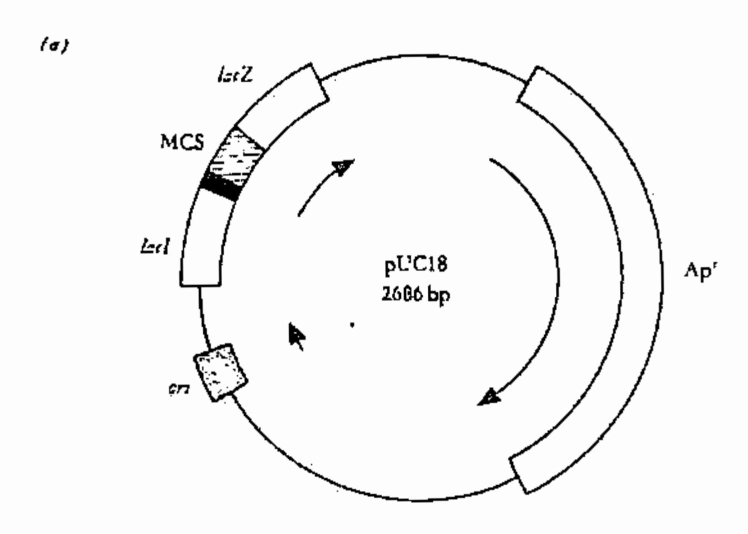


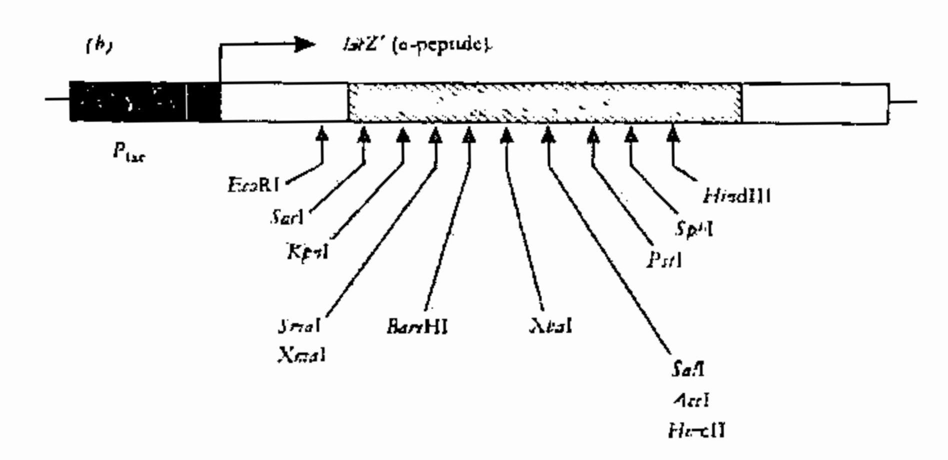
شكل (١٢-٥): خريطة البلازميد ***p*BR322**.

متطلبات وخطوات عملية التحول الوراثى ببكتيريا الأجروباكتيريم

لكى تتمكن بكتيريا الأجروباكتيريم من إصابة أى explant فإنه يجب أن تفرز مركبات قادرة على حثّ جينات الـ vir فى البكتيريا، وهى التى تأخذ الرموز virA، و virB، و virC ... إلخ، وتقع جميعها على البلازميد Ti بالبكتيريا، وتعد المسئولة عن فصل الـ T-DNA ونقله كخيط مفرد من البكتيريا إلى الخلية النباتية، ومن ثم إلى نواة الخلية. يُحاط هذا الـ T-DNA باثنين من الـ 25-bp direct repeats يعرفان باسم

T-DNA borders، وترجع أهميتها إلى أن أى دنا يقع بينهما ينتقل تلقائيًا إلى الخلية النباتية.





شكل (١٢-٦): خريطة البلازميد **pUC18**. تظهر فى الشكل المواقع التالية:

ori: origin of replication.
Ap^r. ampicillin resistance gene.
LacI· lac repressor gene.
MCS. multiple cloning site (or polylinker).
LacZ'· a peptide fragment of β-galactosidase.
P_{lac}: lac promoter
Multiple restriction site in the polylinker sites.

وبهذه الكيفية .. يمكن نقل أى تتابع للدنا (أى جين) إلى النباتات من خلال البلازميدات التى تصبح الأساس فى التحول الوراثى بواسطة الأجروبكتيريم، علمًا بأنه لا ينتقل مع الجين المطلوب نقله أى جين مجاور له؛ كما لا تنقل جينات الضراوة. ونجد أن الطراز البرى للـ Ti plasmid الذى يحمل جينات الهرمونات النباتية فى منطقة الـ T-DNA يتعارض مع عملية إعادة التوالد؛ ولذا .. فإن الـ Ti plasmids التى تستخدم فى عملية التحول الوراثى تكون منزوعة السلاح disarmed (أى منزوعة جينات الهرمونات النباتية).

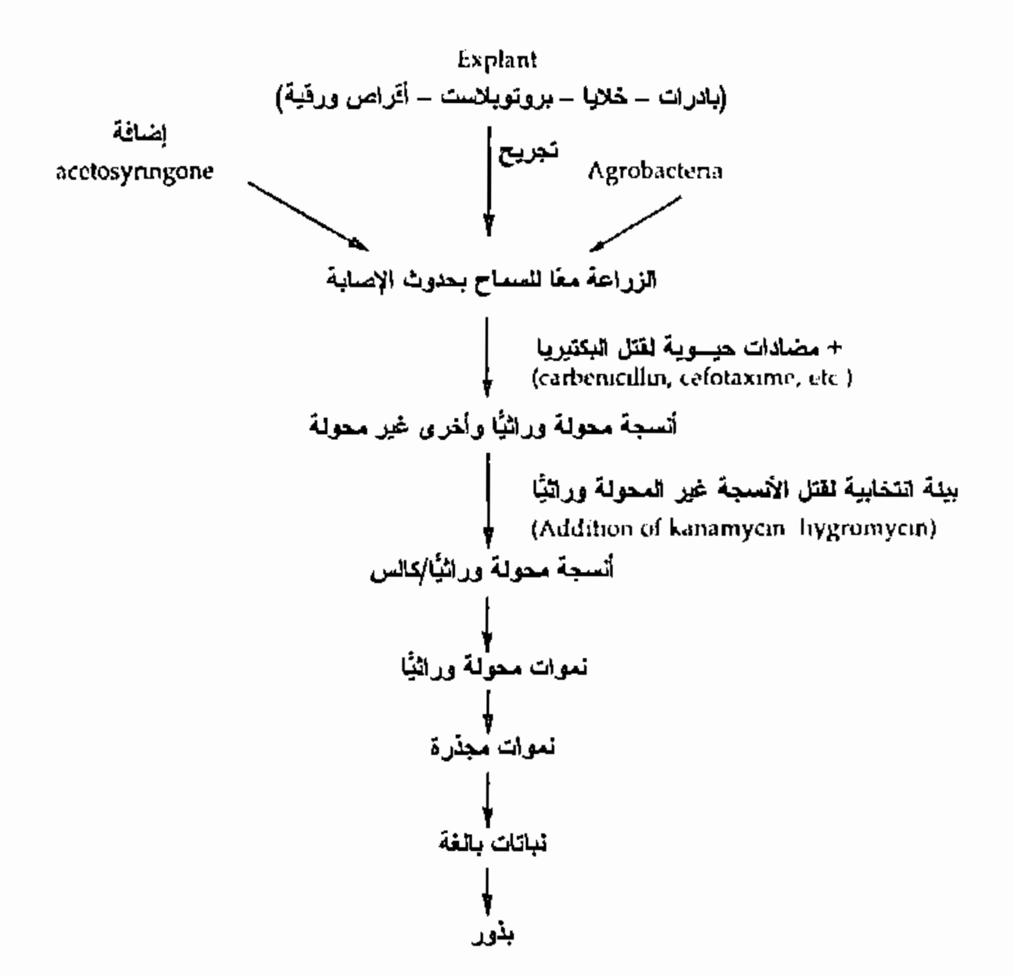
هذا .. وتتم المحافظة على الناقل فى حالة الأجروباكتيريم إما كـ cointegrating vector (حيث يدمج الـ vector فى الـ Ti plasmid)، وإما كـ binary vector (حيث يمتلك الـ vector خاصية التكاثر التلقائى). ويتحقق نقل الجينات بواسطة الأجروباكتيريم. إما من خلال الزراعة الموازية للبكتيريا مع الخلايا النباتية، وإما من خلال تلقيح النبات مباشرة بالبكتيريا بعد إحداث جروح به فى مكان التلقيح (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

يعد التحول الوراثى المعتمد على *A. tumfaciens* الذى يجرى باستعمال البذور أثناء إنباتها أقل كفاءة – بكثير – من استعمال مزارع الأنسجة، ولم تستخدم تلك التقنية بنجاح سوى مع النبات الموديل *Arabidopsis thaliana* (عن Block ١٩٩٣).

تُنَمَّى بكتيريا الرايزوباكتيريم المحتوية على البلازميد الذى يوجد به الجين المراد نقله .. تُنَمَّى مع النباتات الكاملة، أو الأجزاء النباتية explants، مثل: الأوراق الفلقية، والسويقة الجنينية السفلى، والجذور، والكالس، والبروتوبلاست؛ هذا .. إلاّ أن استعمال الأقراص الورقية leaf discs هى الطريقة الأكثر شيوعًا، حيث تعقم سطحيًا، ثم تحقن بسلالة الأجروباكتيريم المناسبة التى تحمل الناقل vector الذى وقع عليه الاختيار، ويزرعا معًا على بيئة تجديد نمو regeneration medium لمدة ٢–٣. أيام فى خلال تلك الفترة تنشط جينات الضراوة فى البكتيريا التى تتلاصق مع خلايا القرص الورقى حول الأجزاء المجروحة، حيث يحدث الانتقال الجينى. ويلى ذلك نقل الأقراص الورقية إلى بيئة تجديد نمو تحتوى على الكاربنسلين carabenicillin بتركيز

٥٠٠ ميكروجرام/مل لأجل قتل البكتيريا، ومضاد حيوى مناسب – مثل الكاناميسين – لتثبيط نمو الخلايا النباتية التى لم تحول وراثيًّا. تظهر النموات الجديدة من الخلايا المحولة وراثيًا فى خلال ٤–٥ أسابيع، حيث تُجَذَّر وتنقل للتربة (شكل ١٢–٧)

تأخذ النباتات المحولة وراثيًّا التى يتجدد نموها من أى نسيج اسم T_0 plants، بينما تأخذ الأجيال التالية الرموز T_1، و T_2، و T_3 ... إلخ (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)



شكل (١٢–٧): خطوات عملية التحول الوراثى عن طريق البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* (عن Chawla ٢٠٠٠).

مزايا وعيوب التحول الوراثى بطريق الأجروباكتيريم

المزايا

تتميز التحولات الوراثية التى تجرى بطريق الأجروباكتيريم بما يلى:

١ - تعد وسيلة طبيعية لنقل الجينات؛ ومن ثم تعد وسيلة أكثر قبولاً لمن يشعرون بأن الطبيعى هو الأفضل.

٢ - تكون البكتيريا قادرة على إصابة الخلايا الكاملة، والأنسجة، والأعضاء؛ وبذا .. لا تعد محددات مزارع الأنسجة مشكلة، ويمكن تجديد نمو النباتات المحولة وراثيًا بصورة أسرع.

٣ - يمكن للأجروباكتيريم نقل أجزاء كبيرة من الدنا بكفاءة عالية.

٤ - تتم عملية دمج الدنا المنقول بدقة كبيرة.

٥ - يكون ثبات الجينات المنقولة جيدًا.

العيوب

إن من أهم عيوب عمليات التحول الوراثى بالأجروباكتيريم، ما يلى:

١ - تتحدد عملية التحول الوراثى بمدى عوائل البكتيريا؛ علمًا بأن بعض الأنواع المحصولية الهامة لا تصاب بتلك البكتيريا. هذا .. إلا أنه أمكن مؤخرًا تطوير سلالات من الأجروباكتيريم على درجة عالية من الضراوة؛ الأمر الذى حدّ قليلاً من تلك المشكلة.

٢ - يكون من الصعب أحيانًا إجراء التحول الوراثى على الخلايا التى يكون من السهل تجديد نموها فى مزارع الأنسجة، وربما يرجع ذلك إلى أن الخلايا ذات الخصائص الجنينية تتواجد فى الطبقات العميقة التى قد يصعب للأجروباكتيريم الوصول إليها (عن Chawla ٢٠٠٠).

هذا .. ولقد نجح التحول الوراثى بطريق الأجروباكتيريم فى عديد من المحاصيل، مثل: الكيوى، وبنجر السكر، ولفت الزيت، واللفت، وعدة أنواع من *Brassica oleracea*، والباباظ، والخيار، والقاوون، والأقحوان، والقرنفل، والفراولة، وفول الصويا، والقطن، ودوار الشمس، والجوز، والكتان، والطماطم، والبرسيم الحجازى، والتبغ، والبسلة، والجوز، والبرقوق، والبطاطس، والعنب (عن Dale وآخرين ١٩٩٣).

التحول الوراثى عن طريق الفيروسات

نظرًا لقدرة الفيروسات على إحداث إصابات جهازية فى النباتات، فقد دُرست إمكانية استخدامها كناقلات فى عمليات التحول الوراثى هذا .. إلاّ أنه تبين أن الغالبية العظمى من الفيروسات التى تصيب النباتات لا تصلح كناقلات للجينات cloning vectors فى عمليات التحول الوراثى، ويرجع ذلك إلى أن حامضها النووى هو من نوع الرنا وليس الدنا.

ولا يوجد من بين جميع الفيروسات التى تصيب النباتات الراقية سوى مجموعتين فقط يوجد فيهما الحامض النوووى على صورة دنا، وهما. فيروسات الجمنى geminiviruses، وفيروسات الكوليمو وبينما لم تثبت فيروسات المجموعة الأولى جدواها – كثيرا – فى عمليات التحول الوراثى، فإن فيرس موزايك القنبيط cauliflower mosaic virus (اختصارًا: CaMV) – الذى يعد من أهم فيروسات مجوعة الكوليمو – استخدم بالفعل فى عديد من عمليات التحول الوراثى.

تعد جينومات كل فيروسات مجموعة الكوليمو صغيرة ولا تتعدى فى حجمها ٨ kb ولقد أمكن التعرف على جميع تتابعات دنا فيرس موزايك القنبيط، وأمكن تمييز ما لا يقل عن ستة جينات به، بالإضافة إلى منطقة واحدة بين جينية (شكل ١٢–٨) ويمكن إيلاج دنا غريب فى تلك المنطقة البين جينية دون أى تأثير على قدرة الفيرس على إحداث الإصابة. وتتميز فيروسات الكوليمو – كذلك – بقدرتها على الانتشار الجهازى فى النباتات من إصابة أولية سطحية بإحدى الأوراق. وبذا .. يمكن الحصول على نباتات محولة وراثيًا دونما حاجة إلى اللجوء إلى مزارع الأنسجة (عن Brown ١٩٨٦)

ولقد تبين بعد محاولات عديدة – غير ناجحة – مع عديد من الفيروسات – ومنها فيرس موزايك القنبيط – لاستعمالها كوسيلة للتحويل الوراثى لأجل إدخال جينات أجنبية فى الهيئة الكروموسومية للنباتات التى يرغب فى تحويلها وراثيًا .. تبين بعد تلك المحاولات أن منطقة التنشيط promoter region المسماة 35S لفيرس موزايك القنبيط cauliflower mosaic virus يمكن التعبير عنها بنجاح فى أنواع نباتية متباينة، وأمكن

تتواجد بصورة طبيعية، ويعرف منها نوعان رئيسيان، هما: *Agrobacterium tumefaciens*، و *A. rhizogenes*، اللذان يعرفان باسم "المهندسون الوراثيون الطبيعيون" natural genetic engineers؛ نظرًا لقدرتهما على تحويل النباتات وراثيًا.

ونجد فى بيئتها الطبيعية أن *A. tumefacines* تسبب مرض التثألل التاجى crown gall وتوجد فى الكروموسوم البكتيرى جينات تتحكم فى تعرف البكتيريا على الخلايا القابلة للإصابة فى العائل، وفى الارتباط بتلك الخلايا هذا إلاّ أن قدرة البكتيريا على نقل الدنا الخاص بها - والذى يدمج فى كروموسوم النبات (عملية التحول الوراثى) - والمقاومة للمضادات الحيوية، والقدرة على الإصابة pathogenicity - كل تلك الصفات يُشفّر لها على بلازميد plasmid خاص فى البكتيريا

ويعد البلازميد قطعة من الدنا تكون مستقلة عن الكروموسوم البكتيرى، ويمكنها الانقسام مستقلة عنه ويعد بلازميد الطراز البرى للـ *A tumefacines* هو المسئول عن إحداث التورمات فى النبات العائل؛ ولذا فإنه يعرف باسم tuber inducing (Ti) plasmids

وعندما تُصيب البكتيريا *A rhizogenes* النباتات فإنه يتكون بها جذورا عرضية بكثافة عالية عند موضع الإصابة؛ الأمر الذى ينظمه الـ Ri plasmid (Ri نسبة إلى root inducing) ولقد طورت نواقل vectors، مثل pRiAu تحتوى على الـ *Ri plasmid* وتعد الـ Ri vectors مفيدة - خاصة - لدراسة تكوين عقد الرايزوبيم الجذرية، ولأجل الحصول على منتجات الأيض الثانوية من مزارع الجذور، وكذلك فى إنتاج الميكوريزا (الـ Vasicular Arbuscular Mycorrhiza؛ عن Chahal Gosal ٢٠٠٢).

وكما أسلفنا فإن قدرة بكتيريا الـ *A. tumefaciens* على الإصابة وإحداث التثألل تعتمد على وجود بلازميد plasmid كبير بالبكتيريا مسئول عن إحداث التثألل يأخذ الاسم Ti plasmid (من tuber-inducing plasmid). وتوجد بهذا البلازميد قطعة من الدنا محددة بـ 25bp من الـ imperfect direct repeats (أو T-DNA من transfer DNA) هى التى تنتقل إلى النبات ولا تلزم الجينات التى تقع على الـ T-DNA لانتقاله واندماجه مع دنا النبات الذى ينتقل إليه، ولكنها تلزم لتمثيل حامض أمينى ومشتقات

ـكرية له تعرف باسم opines، تستعملها البكتيريا كغذاء لها. كما يوجد بالـ T-DNA جينات مسئولة عن تمثيل الأوكسينات والسيتوكينينات أو تعديلها. يؤدى تمثيل هذه الهرمونات النباتية إلى إحداث نمو جديد فى النبات يقود إلى ظهور أعراض التثالل التاجى هذا . ويمكن فصل الجينات المسئولة عن تمثيل الهرمونات النباتية والـ opines من الـ T-DNA واستبدالها بجينات جديدة يُرغب فى نقلها وراثيًا، الأمر الذى تحقق بكفاءة عالية فى كثير من الأنواع النباتية، مثل التبغ، والطماطم، والأرز، والذرة، والبيتونيا، والـ *Arabidopsis* (عن Coury & Feldmann ١٩٩٨)

مدى عوائل الأجروبكتيريم

استمر الاعتماد على البكتيريا *A. tumefaciens* لفترة طويلة كطريقة مفضلة لإجراء التحولات الوراثية فى ذوات الفلقتين، التى يعرف جيدًا كيفية تجديد نموها النباتى من مزارع الأنسجة ويتضمن مدى العوائل لهذه البكتيريا حوالى ٦٠٪ من معراة البذور، وكل ذوات الفلقتين من مغطاة البذور. كذلك أمكن تحقيق التحول الوراثى باستعمال الأجروباكتيريم بنجاح فى بعض أنواع ذوات الفلقة الواحدة، مثل الأسبرجس *Asparagus officinalis*، والنرجس narcissus، واليام *Discoria bulbifera* وقد أفاد فى هذا الشأن معاملة الأجروبكتيريم المستعملة بإفرازات الجروح (وهى مركبات فينولية) من درنات البطاطس، أو ببعض المركبات الفينولية المخلقة معمليًا مثل الـ acetosyringone إما أثناء النمو البكتيرى، وإما أثناء زراعتها المشتركة مع النسيج المراد تحويله وراثيًا كذلك أمكن تحويل الأرز وراثيًا باستعمال الأجروباكتيريم، وطبقت الطريقة التى استخدمت معه فى عمليات تحول وراثى ناجحة فى كل من الشعير، والقمح، والذرة، وقصب السكر (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

لا تعد غالبية النباتات الوحيدة الفلقة من العوائل الطبيعية للأجروباكتيريم المستخدمة فى عمليات التحول الوراثى، فلم تثبت القابلية للإصابة بالبكتيريا – فى غير ذوات الفلقتين – سوى فى الأنواع التابعة للرتبتين: Liliales، و Arales. وبالمقارنة ثبتت المقاومة للبكتيريا فى جميع النباتات التى اختبرت من رتبة Poales، إلا أن بعض

ومن الطبيعي أن التحول الوراثي لبعض خلايا الميرستيم يمكن أن يؤدى إلى إنتاج كيميرا بها نسيج محول وراثيًا وآخر غير محول؛ إلاّ أن الأجزاء المحولة وراثيًا يمكن أن تشتمل على نموات منتجة للجاميطات، وبذا ينتقل الجين المعنى بعملية التحول الوراثي إلى النسل، الذى يكون متجانسًا ومشتملاً على نسيج واحد محول وراثيًا.

ولأجل توصيل الجينات المعنية بعملية التحول الوراثي إلى الخلايا القادرة على النمو المباشر الطبيعي اتجه الباحثون نحو الطرق الكيميائية والفيزيائية (طرق النقل المباشر)، حيث نجحوا فى التوصل إلى عديد من تلك الطرق (شكل ١٢-٩).

ولقد أمكن بنجاح كبير استخدام طرق النقل المباشر للجينات فى التغلب على مشكلة عدم قدرة الأجروباكتيريم والفيروسات على إصابة بعض الأنواع النباتية. وهنا .. يصل الدنا المراد إدخاله فى الخلايا المعنية بالتحول الوراثي إما بامتصاص الخلايا له مباشرة، وإما من خلال عمليات فيزيائية أو كيميائية معينة، وتتنوع كثيرًا الطرق المستخدمة فى هذا الشأن، كما تتباين معها الأجزاء النباتية التى يتعين استخدامها فى عملية التحول الوراثي، كما يأتى بيانه.

هذا .. وتعد حبوب اللقاح مثالية كمتلق للجينات الجديدة فى دراسات الهندسة الوراثية؛ فهى ليست فقط صالحة لتلقى الدنا بطريقتى القذف الدقيق microinjection، والتثقيب الكهربائى electroporation (حيث تكون الأنابيب اللقاحية لحبوب اللقاح خالية من الجدر الخلوية)، ولكنها أيضًا - وعلى خلاف البروتوبلاستات - ليست بحاجة إلى أن يُجدد النمو منها؛ فهى ذاتها الوسيلة الطبيعية لتوصيل الدنا من جيل لآخر. ولا يُعد جمع حبوب اللقاح وتخزينها أمرًا صعبًا أو مكلفًا مقارنة بمزارع الأنسجة. هذا إلاّ أن حبوب لقاح بعض الأنواع النباتية لا تحتفظ بحيويتها لفترات طويلة، وقد تفقد حيويتها بعد فترة قصيرة من تحويلها وراثيًا.

ومن بين الطرق التى اتبعت فى التحويل الوراثى للحبوب النجيلية الصغيرة (والتى سنتناولها وغيرها من الطرق بالشرح)، ما يلى (عن Jahne وآخرين ١٩٩٥):

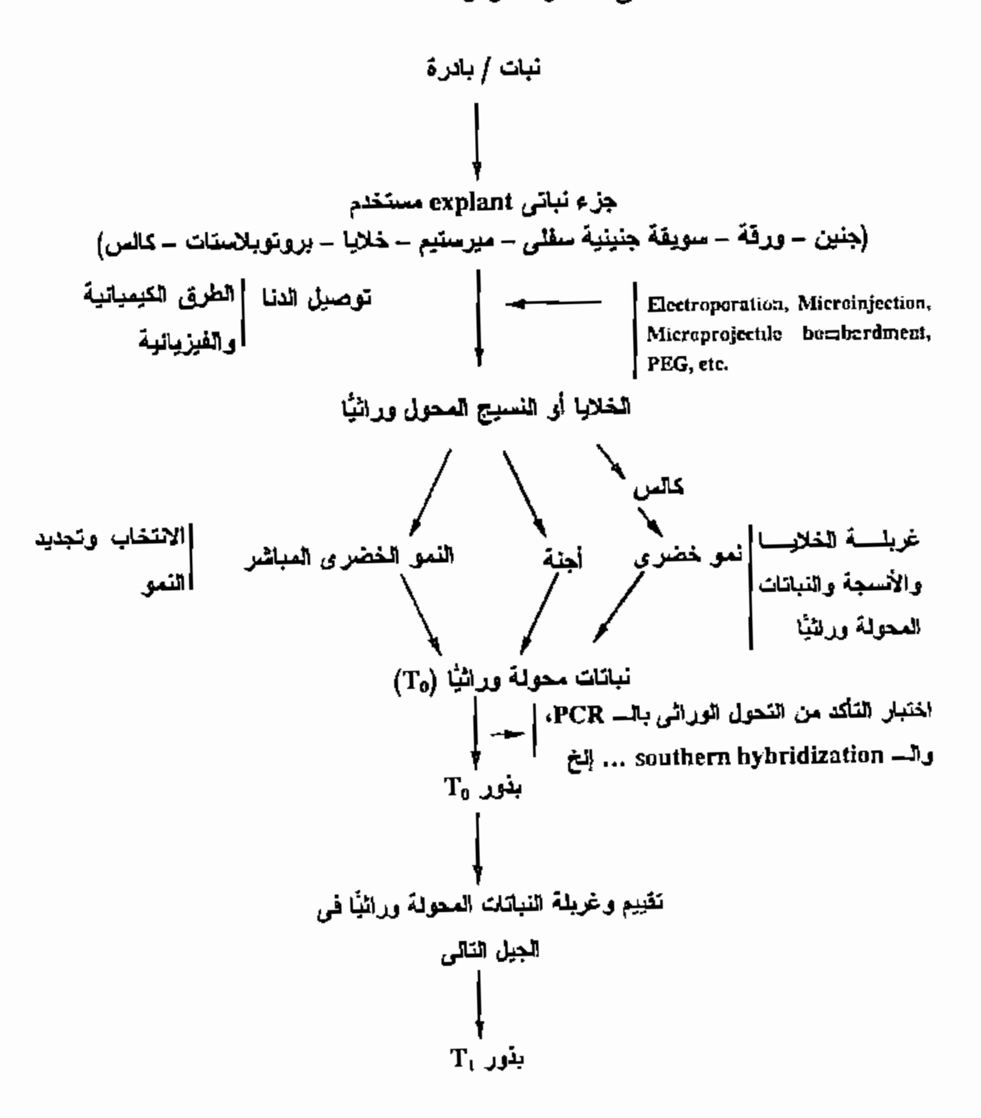
١ - الحث الكيميائى لالتقاط البروتوبلاستات للدنا.

٢ – الحث الكهربائى لالتقاط البروتوبلاستات للدنا.

٣ – قذف الخلايا والأنسجة بأجسام صغيرة مغلفة بالدنا.

٤ – التثقيب الكهربائى للأنسجة بما يسمح بدخول الدنا.

٥ – الحقن الدقيق للدنا فى الأجزاء الزهرية للخلفات.



شكل (١٢–٩): المخطط العام لإنتاج نباتات محولة وراثيًا بطرق النقل المباشر للجينات.

٦ – الحقن الدقيق للدنا فى الخلايا الأمية لحبوب اللقاح، والخلايا الناتجة منها، ومبادئ الأجنة، باستعمال أجسام صغيرة مغلفة بالدنا.

٧ – التقاط حبوب اللقاح - النابتة – للدنا.

٨ – تشريب الأجنة بالدنا

حصول البروتوبلاست على الدنا بطريقة فيزيائية/كيميائية

تعرف عملية حصول البروتوبلاست على الدنا بطريقة فيزيائية/كيميائية باسم physico chemical uptake of DNA، وفيها يخلط plasmid DNA (أى vector) مع بروتوبلاستات النبات المرغوب فى تحويله وراثيًا فى وجود البوليثيلين جليكول PEG، وكحول البولى فينيل polyvinyl alcohol، وفوسفات الكالسيوم التى تحفز التقاط البروتوبلاست للدنا. وبعد نحو ١٥–٢٠ دقيقة من التحضين يزرع البروتوبلاست فى وجود عامل انتخابى مناسب، حيث تجدد البروتوبلاستات المحولة وراثيًا - فقط - نموها

يعتمد نجاح هذه الطريقة على قدرة البروتوبلاست على تجديد النمو منه، وقد نجحت مع كل من الصليبيات، والفراولة، والخس، والأرز، والقمح، والذرة

التحول الوراثى بطريقة تحوصل الليبوسومات

إن الليبوسومات lyposomes عبارة عن أكياس دهنية دقيقة تحتوى على عدد كبير من البلازميدات. وقد طورت طريقة تحوصل الليبوسومات lyposome encapsulation لأجل حماية الدنا الغريب أثناء عملية نقله إلى عائله الجديد. ولقد وجد أنه عند خلط الدنا المحصور داخل تلك الحويصلات الدهنية مع البروتوبلاستات تحت ظروف مناسبة فإنه يخترق البروتوبلاستات، حيث يؤدى نشاط إنزيم الليبيز lipase بالبروتوبلاست إلى إذابة الحويصلات الدهنية، لينطلق منها الدنا، لكى يجد طريقه إلى الإندماج فى جينوم العائل

هذا ولم يشع استعمال هذه الطريقة، بسبب صعوبة تركيب الحويصلات الدهنية

مع اعتمادها على مدى نجاح تجديد النمو من البروتوبلاست (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

التحول الوراثى باستخدام أشعة الليزر

تستخدم أشعة الليزر فى عمل فتحات دقيقة فى الخلايا، التى تُدفع - بدورها لالتقاط الدنا الذى يوفَّر فى البيئة المحيطة بها (عن Bhat ٢٠٠٠).

التحول الوراثى بالاستعانة بألياف كاربيد السيليكون

يتم تعريض الخلايا المراد تحويلها وراثيًّا مع ألياف كاربيد السيليكون silicon carbide (٠,٦ ميكروميتر × ١٠-٨٠ ميكروميتر) لدوامّة من اللف الدورانى vortexing فى محلول منظم يحتوى على الدنا. تقوم الألياف باختراق الخلايا، ويتم - ربما من خلايا الدوامّة - دخول الدنا فى تلك الخلايا. وقد أمكن بتلك الطريقة إنتاج نباتات ذرة وتبغ محولة وراثيًّا ورغم بساطة هذه الطريقة، فإن ألياف كاربيد الكالسيوم تعد مسرطنة (عن Chopra ٢٠٠٠).

طريقة تحضين البذور مع الدنا

أمكن الحصول على بعض حالات التحول الوراثى عندما وضعت البذور النابتة فى محلول الدنا كذلك فإن البذور الجافة المنزوعة الغلاف البذرى يمكنها التقاط الدنا عندما تستنبت فى محلول من الدنا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

طريقة التثقيب الكهربائى

تستخدم طريقة التثقيب الكهربائى electroporation مع كل من البروتوبلاستات، والأجنة، والقمم الميرستيمية المهضومة جزئيًّا بواسطة إنزيمات محللة للجدر الخلوية. تتضمن الطريقة إطلاق شحنة كهربائية فجائية - بين قطبين من البلاتين - فى إناء صغير جدًّا يحتوى على البروتوبلاستات النباتية وجزيئات الدنا فى محلول ملحى منظم. يؤدى إطلاق الشحنة إلى إحداث ثقوب عديدة فى آن واحد فى مواضع مختلفة من

الأغشية البلازمية، بما يسمح لجزيئات الدنا بالمرور إلى داخل الخلايا. وتكون الخطوة التالية محاولة تجديد النمو النباتى من تلك البروتوبلاستات، وهو أمر يصعب تحقيقه من بروتوبلاستات مفردة فى عديد من الأنواع النباتية. ولقد أمكن باتباع هذه الطريقة الحصول على نباتات محولة وراثيًا من كل من التبغ، والذرة والأرز.

وعند استخدام الميرستيمات القمية بعد هضمها جزئيًا، فإنها تغسل أولاً من تلك الإنزيمات ثم تنقل إلى بيئة زراعة مناسبة، لتخلط بجزيئات الدنا قبل تعريضهما معًا للشحنة الكهربائية، ثم يسمح لها بالنمو مباشرة إلى نباتات كاملة، وبذا .. يمكن تجنب مشكلة صعوبة تجديد النمو التى تحدث عند استخدام البروتوبلاستات (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣، و Jahne وآخرين ١٩٩٥).

كذلك نجح استعمال هذه الطريقة فى الحصول على نباتات محولة وراثيًا بإدخال الدنا فى الأجنة غير المكتملة التكوين، والكالس الجنينى، وشرائح الأجنة المكتملة النمو من الأرز بعد تجريحها إنزيميًا أو ميكانيكيًا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

التحول الوراثى بطريق الحقن الدقيق

إن من أهم مشاكل الحقن الدقيق microinjection لأجل عمليات التحول الوراثى ضرورة أن يتم الحقن دون الإضرار بالأغشية البروتوبلازمية الداخلية tonoplasts التى تحيط بالفجوات العصارية، لأن حدوث ذلك يعنى انطلاق أنواع عديدة من المركبات السامة من الفجوات إلى السيتوبلازم. ولقد طورت لأجل عملية الحقن ما يعرف بتقنية الماصة الماسكة holding pipette. وفى هذه الطريقة يتم الإمساك بالبروتوبلاستات فى ماصات بقطر ٥-١٠ ميكروميتر بالشفط الهادئ. ويلى ذلك حقن حوالى ٢ بيكوليتر من الدنا الغريب فى أنوية البروتوبلاستات باستعمال ماصات سعة ٠,٢ ميكروليتر، ومن ثم يجدد النمو من البروتوبلاستات.

ورغم صعوبة طريقة الحقن الدقيق فإنها يمكن أن تستخدم فى حقن كروموسومات كاملة أو حتى بلاستيدات خضراء وميتوكوندريات. ولقد نجح استعمال هذه الطريقة فى

إجراء التحول الوراثى فى كل من التبغ، والبرسيم الحجازى، وجنس *Brassica* (عن Chahal Gosal ٢٠٠٢).

التحول الوراثى بطريقة الحقن فى النباتات ذاتها، وخاصة فى مبايض الأزهار.

أجريت عمليات تحول وراثى بحقن الدنا - مباشرة - فى نباتات كاملة من الراى rye (الجاودار) يجرى الحقن العادى هذا (الـ macroinjection) باستعمال حجم كبير نسبيًا من الدنا الغريب فى نورة النبات - قبل ١٤ يومًا من بدء الانقسام الاختزالى فيها - أى وهى مازالت بعد فى مرحلة التكوين، وذلك باستعمال محقنة (سرنجة)

وقد تحقق ذلك بحقن خلفات الراى بدنا بلازميدى plasmid DNA يحتوى على جين NPT II يرتبط بـ nos promoter. يقع داخل تلك الخلفات الخلايا الـ archesporial التى تنتج حبوب اللقاح بعد مرورها بعملية انقسام ميوزى فى الكيس اللقاحى المتكون ولقد أوضحت الدراسات أن الخلايا الـ orchesporial تكون منفذة للكافيين والكولشيسين قبل أسبوعين من الطور الاستوائى للانقسام الميوزى الأولى؛ الأمر الذى أثار التساؤل حول ما إن كانت تلك الخلايا قادرة - كذلك - على استقبال الجزيئات الأكبر مثل الدنا.

لقحت النباتات التى حقنت بالدنا البلازميدى معًا، واختبرت البذور الناتجة لقدرتها على الإنبات فى وجود الكاناميسين ومن بين ٣٠٢٣ بادرة تم اختبارها عاشت سبع واحتوت اثنتان منها - فقط - على نشاط الـ NPT II (عن Walden ١٩٨٨)

كذلك قام Chen وآخرون (١٩٩٨) باستخلاص الدنا الكلى من أوراق صنف الكوسة Pai Chu Tso المقاوم للذبول الفيوزارى الذى يسببه الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*، ثم قاموا بهضمه بواسطة EcoRI، و HindIII وأعقب ذلك حقن ٢ ميكروليتر من الدنا المهضوم فى مبايض أزهار صنف البطيخ الهجين Pink Orchid بعد ٢٤، و ٤٨، و ٧٢ ساعة من التلقيح أدت تلك العملية إلى الحصول على ١٠ نباتات محولة

وراثيًا ومقاومة لفطر الذبول الفيوزارى، ويذكر الباحثون أن ذلك التحول الوراثى حدث من خلال مسار أنبوبة اللقاح. وأوضح تحليل RAPD أن النباتات المحولة وراثيًا ظهر بها شرائط bands مماثلة لتلك التى تظهر فى تحليل الـ RAPD للكوسة.

النقل المباشر للجينات من خلال مسار الأنابيب اللقاحية

أمكن إنتاج نباتات أرز محولة وراثيًا بإدخال الدنا فى الأنابيب اللقاحية. ولتحقيق ذلك تم قطع مياسم الأزهار بعد التلقيح، مما أدى إلى قطع الأنابيب اللقاحية وظهورها عند الجزء المقطوع، وبوضع الدنا على هذا السطح المقطوع .. فإنه يتسرب إلى داخل الأنابيب اللقاحية - التى تكون مازالت فى القلم - ومن ثم إلى البويضات.

طريقة القذف المدفعى الدقيق

تعرف طريقة القذف المدفعى الدقيق باسم microprojectille bombardment، وهى تعتمد على خاصية الـ porticle acceleration باستعمال biolistics خاصة تعمل على دفع الدنا داخل الخلايا بقوة تكفى لأن يندمج جزءًا منه فى دنا تلك الخلايا وذلك بعد اختراقها للجدر والأغشية الخلوية. وتجرى العملية بتغليف جزيئات دقيقة (٠,٢-٠,٧ ميكروجرام) من الذهب أو التنجستين بالدنا الغريب لدفعها فى الخلايا النباتية المراد تحويلها وراثيًا.

وقد اتبعت طريقتان لإسراع دفع تلك الجزيئات الدقيقة، هما: استعمال غاز هيليوم تحت ضغط، أو بطاقة كهروستاتيكية تنطلق من قطرة ماء تعرض إلى تيار كهربائى ذات فولت عالٍ.

وكانت أولى الأجهزة التى استخدمت فى هذه الطريقة تعتمد على وضع بارود gunpowder خلف خرطوشة cartridge لإسراع قذف الجزيئات الدقيقة، ودفعها عميقًا داخل النسيج النباتى، ولذا فإنها عرفت باسم particle gun. وقد شاع استعمال هذه الطريقة نظرًا لإمكان استعمالها مع أى نسيج أو عضو نباتى ومع أى نوع من النباتات، كما يمكن معها قذف أى كمية من الدنا الغريب. وهى طريقة يمكن استعمالها مع النمو

القمى الخضرى، وأنصال الأوراق، وحبوب اللقاح، والخلايا المزروعة، والجذور، وأجزاء النموات الخضرية. وقد طبقت على عديد من الأنواع النباتية مثل السعير، والقطن، والذرة، والأرز، وفول الصويا، وقصب السكر، ودوار الشمس، والقمح (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

وتعرض عدة أنواع من أجهزة القذف المدفعى الدقيق المستخدمة فى عمليات التحول الوراثى، منها ما يلى:

١ - جهاز Biolistic PDS-1000/He (Kikkert ١٩٩٣)

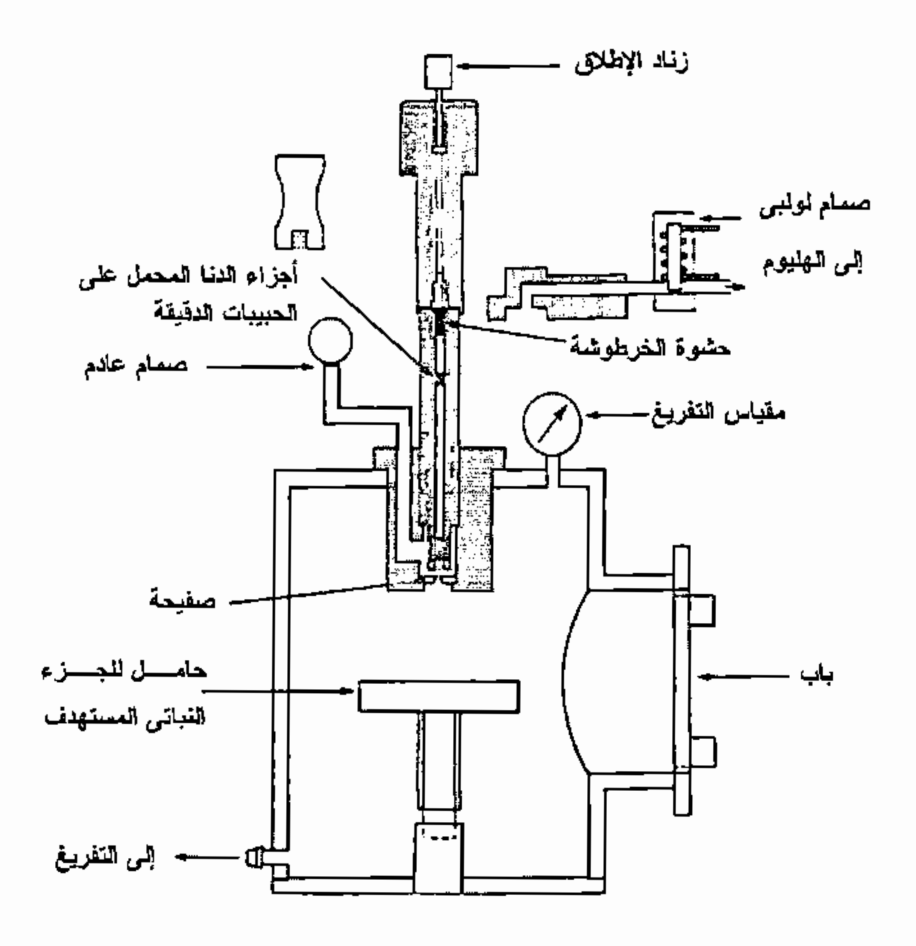
٢ - جهاز Particle Inflow Gun (Vain وآخرون ١٩٩٣).

٣ - جهاز توجيه دقيق microtargeting device للقذف المدفعى قادر على توجيه ٨٠٪ من الجزيئات المقذوفة إلى مساحة يبلغ قطرها ١٥٠ ميكروميتر - وهى تعادل مساحة ميرستيم - مع وصول الجينات المحمولة على الجزيئات المقذوفة إلى ٣٪ من الخلايا المعرضة للقذف المدفعى الموجه إليها (Sautter ١٩٩٣)

ويعد التهديف الدقيق microtargeting هو الطريقة المثلى لتوصيل الدنا إلى القمة النامية الخضرية للنبات يسمح الجهاز المستخدم (الـ microtargeter) بتوجيه قدر من القذائف الدقيقة microprojectiles إلى النسيج الميرستيمى القمى وتجمع هذه الطريقة بين مزايا الحقن الدقيق microinjection (وهو الذى يسمح بالتنبؤ بالموقع الذى يصله الدنا) ومزايا القذف البيولوجى (الذى يتحقق بواسطته عدة طلقات فى كل مرة؛ عن Agrawal ١٩٩٨)

هذا . ويبين شكل (١٢-١٠) تخطيطا لجهاز يستعمل فى القذف الدقيق particle bombardment ويعطى شكل (١٢-١١) مزيدًا من التفاصيل لأجزاء الجهاز المستخدم أما شكل (١٢-١٢) فإنه يوضح مقارنة بين التحول الوراثى بطريقتى القذف المدفعى الدقيق والأجروباكتيريم

تكون جزيئات الذهب أو التنجستون المستعملة فى عملية القذف الدقيق بقطر ٤ ميكروميتر



شكل (١٢-١٠): تخطيط لجهاز يستعمل فى القذف الدقيق (عن Franks & Birch ١٩٩١).

بعد وصول الدنا المحمل على هذه الجزيئات إلى داخل الخلايا فإنه يُستنسخ فى صورة رنا، وهو الذى يترجم - بدوره - إلى بروتين.

عندما تحول الأجنة وراثيًّا بطريقة القذف الدقيق، فإن بعض خلايا الجنين فقط هى التى يحدث فيها التحول الوراثى، وعند زراعة هذه الأجنة فى بيئات صناعية والحصول على نباتات كاملة منها فإن أجزاء كاملة منها قد تكون محولة وراثيًّا إذا ما نما كل منها من خلية مفردة حدث فيها التحول الوراثى، ولكن تبقى أجزاء أخرى من تلك النباتات غير محولة وراثيًّا. ونظرًا لأن الأزهار الكاملة يمكن أن تنمو من عدد محدود

من الخلايا المحولة وراثيًا التى قد تنتج من انقسامات متتالية لخلية واحدة محولة وراثيًا . لذا فإنه من الممكن الحصول على بذور محولة وراثيًا من أجزاء النبات التى حدث فيها التحول الوراثى (عن Chrispeel & Sadava ٢٠٠٣)

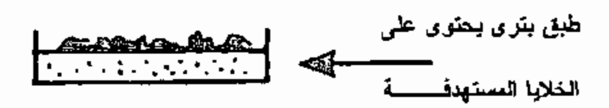
زناد الإطلاق وحشوة الخرطوش

حبيبات دقيقة من الذهب أو التنجستون لتحميل الدنا عليها

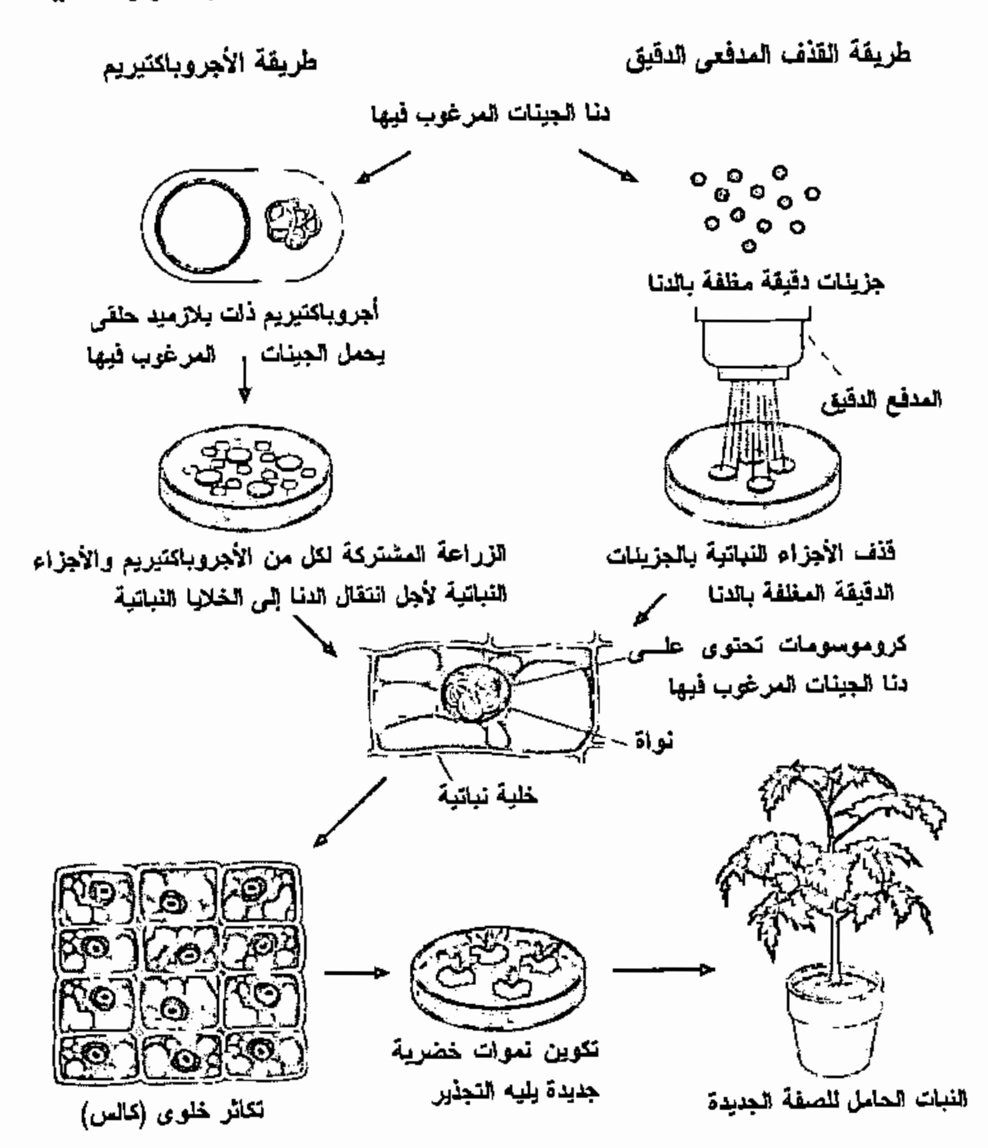
أجزاء الدنا

منافذ

صفيحة



شكل (١٢-١١): تخطيط يظهر تفاصيل جهاز القذف المدفعى الدقيق.



شكل (١٢-١٢): مقارنة بين التحول الوراثى بطريقتى القذف المدفعى الدقيق والأجروباكتيريم (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

هذا .. إلاّ أن معدل حدوث التحولات الوراثية بتلك الطريقة يعد منخفضًا، ويتطلب الأمر الاختيار الدقيق للنسيج المستعمل فى التحويل الوراثى، والتحكم فى الظروف البيئية قبل القذف الدقيق وبعده، وحسن اختيار المعلم الانتخابى. وعلى الرغم من نجاح

إجراء التحول الوراثى باستعمال المزارع غير المتميزة undifferentiated cultures، إلا أنه يفضل توصيل الدنا إلى الـ explants ذاتها، والتى يكون لها قدرة كبيرة على استعادة النمو ولقد استخدمت فى النجيليات – بنجاح – كلاً من الـ scutellar tissues، والميرستيمات

ولقد استخدمت تلك الطريقة فى نحو ٢٠٠ بحث منشور حتى نهاية عام ١٩٩٥ فقط، وذلك منذ بداية اكتشافها فى عام ١٩٨٧، وهى تعد – حاليًا – ثانى أكثر طرق التحول الوراثى استعمالاً بعد طريقة الأجروباكتيريم.

ولقد نجح استعمال طريقة القذف المدفعى الدقيق فى تحقيق ما يلى:

١ – التحول الوراثى للميرستيمات والأنسجة مع درجة عالية من القدرة على استعادة النمو.

٢ – توصيل الدنا المرغوب فيه إلى الخلايا الكاملة، والأنسجة، والأعضاء دونما محددات كتلك التى ترتبط بقدرة الأجروباكتيريم على إصابة النبات المراد تحويله وراثيًا، أو القدرة على استعادة النمو عند اللجوء إلى مزارع الأنسجة.

٣ – التحول الوراثى لعضيات الخلية مثل الكلوروبلاستيدات. وكذلك حبوب اللقاح

٤ – التحول الوراثى للنجيليات، والبقوليات، والأنواع الخشبية التى يصعب تحويلها بالطرق الأخرى.

٥ – تسمح باستعادة النمو من عديد من الأصناف التجارية التى يمكن تحويلها وراثيًا

٦ – تسمح بزيادة كفاءة التحول الوراثى بواسطة *Agrobacterium tumefaciens* بسبق قذف الأنسجة – التى تعرض للبكتيريا – بالدنا (عن Rajesh Luthra وآخرين ١٩٩٧).

وقد استعرض Rajesh Luthra وآخرون (١٩٩٧) – فى جدول – جميع دراسات الـ microprojectile bombardment التى نشرت حتى ديسمبر ١٩٩٥. والتى تضمنت أنواعًا من ثلاثين عائلة نباتية، وتضمن الحصر – كذلك – نوع النسيج أو العضو النباتى

المستخدم فى الدراسة، وكذلك الـ plasmid construct (أى الـ reporter/selectable gene) المقذوف به ويتبين من استعراض الجدول أن أكثر تطبيق لتلك التقنية كان على أنواع اقتصادية هامّة من العائلات النجيلية، فالباذنجانية، فالبقولية، فالصنوبرية Pinaceae، فالقرعية، إلا أن الحصر تضمن – كذلك – عائلات هامة، مثل العليقية، والصليبية، والزنبقية، والخبازية .. وغيرها كثير.

وفى فول الصويا يجرى التحول الوراثى باستخدام محاور الأجنة embryonic axes المكتملة النمو أو غير المكتملة، فبعد فصلها من البذور تعرض للقذف الدقيق بالجين المرغوب فيه، ثم تزرع هذه الـ explants على بيئة موراشيج وسكوج مزودة بمستويات عالية من السيتوكينين. تعطى هذه الـ explants نموات جديدة بسهولة فى خلال أسبوعين من زراعتها، وهى نموات أوضحت الدراسات الهستولوجية نشأتها من كل من الميرستيمات الأولية والجانبية وبعد مرور ٦–١٠ أسابيع تكون النموات قد استطالت بالقدر الذى يكفى لنقلها إلى بيت محمى، إما بعد تجذيرها على بيئة خالية من الهرمونات، وإما بتطعيمها على بادرات فول صويا ويمكن – عادة – الحصول بهذه الطريقة على حوالى ٥–٢٠ نموًا من كل explant معامل

ولقد تبين أن عددًا من النباتات التى حُصل عليها بهذه الطريقة احتوت على الجين المنقول فى جميع خلاياها، مما يدل على نشأتها من خلايا مفردة (عن Christou ١٩٩٤)

هذا وقد نجحت هذه الطريقة – كذلك – مع الفاصوليا، واستخدمت بالفعل فى تحويلها وراثيًا بجينات الـ β-glucuronidase، والمقاومة لمبيدات الحشائش والمقاومة للفيروسات

لقد نجحت تقنية القذف الدقيق للجينات فى عديد من عمليات التحول الوراثى للنباتات، كما فى الشعير، والقطن، والخيار، والباذنجان، والذرة، والبصل، والأرز، وفول الصويا، والتبغ، والقمح، كما نجحت – كذلك – مع عديد من الطحالب والفطريات واستخدمت هذه الطريقة فى معاملة كلا من البادرات، ومزارع المتوك،

ومزارع الكالس، والأجنة غير المكتملة التكوين، ومزارع معلقات الخلايا. والسويقة الجنينية السفلى، وطبقة الأليرون (كما فى الذرة)، وحبوب اللقاح، وغيرها من الأنسجة والأعضاء النباتية (عن Franks & Birch ١٩٩١، و Jansson & Maenpa ١٩٩٩) ويعد القمح أكثر المحاصيل الزراعية التى استعملت معها طريقة القذف المدفعى الدقيق للقمة الخضرية الميرستيمية (عن Sautter وآخرين ١٩٩٥).

ويفيد القذف المدفعى الدقيق ليس فقط فى إجراء عمليات التحول الوراثى للنباتات التى يصعب إصابتها ببكتيريا الأجروباكتيريم، ولكن كذلك فى التحول الوراثى لكل من عضيات الخلية (مثل الميتوكوندريا، والكلوروبلاستيدات)، والميكروبات (مثل *Bacillus megabacterium*، و *Magnoportha grisea*)، والخلايا والأنسجة الحيوانية (عن Klein وآخرين ١٩٩٢).

انتخاب الخلايا المحولة وراثيًا ووسائل تأكيد التحول الوراثى

لا ينتقل الدنا فى عمليات التحول الوراثى إلاّ إلى نسبة ضئيلة جدًا من الخلايا فى التجربة الواحدة. ولا يندمج بثباتٍ فى كروموسومات النوع المتلقى إلا فى نسبة ضئيلة جدًا من تلك الخلايا التى تلقت الدنا، هذا بالإضافة إلى أن الدنا المنقول والمندمج بثبات فى الخلايا لا يعبر عن ذاته سوى فى أعداد قليلة من تلك الخلايا ولذا فإن التوصل إلى طريقة سهلة للتعرف على البروتوبلاستات أو الخلايا المحولة وراثيًا يعد أمرًا حاسمًا بالنسبة لنجاح برنامج التحول الوراثى من عدمه.

إن الخلايا أو النباتات المحولة وراثيًا يمكن التعرف عليها عادة بصورة غير مباشرة من خلال الجينات المعلمة التى تكون على ارتباط شديد بالجينات المنقولة وفى غياب الانتخاب فإن الخلايا غير المحولة وراثيًا تطغى فى نموها وتكاثرها على الخلايا المحولة ويمكن إعطاء الخلايا المحولة وراثيًا قدرة تنافسية على البقاء بتضمين الـ gene construct المنقول جينًا يسمح لتلك الخلايا بالنمو فى ظروف تعد مثبطة لنمو الخلايا غير المحولة وراثيًا كذلك فإن الخلايا المحولة وراثيًا قد يمكن التعرف عليها إذا أمكن ملاحظة التعبير الجينى للجين المنقول بصورة مباشرة، كما فى حالة المقاومة لمبيدات

الحشائش، حيث تموت كل الخلايا غير المحولة وراثيًا بفعل مبيد الحشائش، بينما تبقى فقط الخلايا المحولة وراثيًا.

تعرف الجينات التى يتم تضمينها فى الـ gene construct – بهدف التعرف على الخلايا والبروتوبلاستات المحولة وراثيًا – باسم الجينات الدالة أو المُعَلِّمة أو المُخبرة marker genes، وهى على نوعين:

١ – معلمات انتخابية selectable markers.

٢ – معلمات غربلة screenble (scorable) markers.

كذلك توجد فئة ثالثة من الجينات التى يتم تضمينها فى الـ gene construct – تعرف باسم الجينات المؤسسة أو المعززة promoter genes – وهى التى تؤسس للتعبير الجينى (للجين المعنى بعملية التحول الوراثى)، أو تعزز ظهوره فى أنسجة أو أعضاء معنية أو فى مراحل عمرية معينة دون غيرها.

أولاً: المعلمات الانتخابية

إن الجين المعلم الانتخابى selectable marker gene الجيد هو ذلك الذى يوفر مقاومة ضد عقار drug ما، أو مضاد حيوى، بحيث يوقف نمو الخلايا النباتية الطبيعية (تلك التى لا تحمل الجين المعلم). ويجب أن يقوم المركب المستعمل فى وقف النمو النباتى أو قتله بعمله ببطء، ذلك لأن القتل السريع للخلايا النباتية غالبًا ما يكون مصاحبًا بانطلاق لمركبات فينولية ومركبات أخرى من الخلايا الميتة، تكون سامة للخلايا المتبقية المقاومة أصلاً للمركب المستعمل.

ومن أكثر الجينات المعلمة استعمالاً وأكثرها شيوعًا فى دراسات الهندسة الوراثية، تلك التى توفر مقاومة ضد المضادات الحيوية التالية:

١ – الكاناميسين kanamycin، والجلوكوسيد الأمينى القريب منه G418 (والأخير هو الأكثر فاعلية فى تثبيط النمو فى الـ eukaryotes) وهما الأكثر استعمالاً.

٢ – الجنتاميسين gentamicin

٣ – الجنتاميسين gentamicin

٤ – الهيجروميسين hygromycin

٥ – الكلورامفينيكول chloramphenicol.

٦ – التراى ميثوبريم trimethoprim.

ومن أكثر الجينات المعلمة استعمالاً الجين Kan^r من *E coli*، وهو يشفر لتكوين الإنزيم neomycin phosphotransferase type II (اختصارا: NPTII)، ويطلق على هذا الجين – وأمثاله من جينات وحيدات الخلية procaryotes – عند استعمالها فى النباتات المحولة وراثيًا اسم chimeric selectable marker genes نظرًا لحتمية إجراء تعديلات عليها لكى يمكنها التشفير للإنزيم المطلوب فى النباتات. وأكثر تتابعات الـ promoters استخدامًا هى تلك المتحصل عليها من كل من جين الـ nopaline synthase (يأخذ الرمز nos) من الـ Ti plasmid، والـ 35S transcript الخاص بفيرس موزايك القنبيط.

ومن أكثر الجينات الانتخابية الكيميرية chimeric selectable marker genes استخدامًا ذلك الذى يحمل التركيب:

CaMV 35S promoter/NPTII coding sequence/Ti nos termination sequence

يأخذ هذا الجين الكيميرى – عادة – الرمز 35S/NPTII/nos.

وبالاستعانة بتقنيات الدنا أمكن بجهد جهيد إحلال هذا الجين محل الجين المسئول عن تكوين الورم السرطانى فى الـ T-DNA للـ Ti plasmid (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).

وعلى الرغم من عدم توفر أى دليل على إمكانية انتقال جينات المقاومة للمضادات الحيوية تلك من النباتات المحولة وراثيًا إلى الكائنات الدقيقة، فإنه يوجد تخوف لدى البعض من المعترضين على تطبيقات الهندسة الوارثية من أن وجود تلك الجنيات فى النباتات التى يستهلكها الإنسان قد يشكل خطورة عليه، ولذا. يتم حاليًا التخلص منها بعد الانتهاء من عملية التحول الوراثى

ويبين جدول (١٢-٢) تفاصيل عدد من المعلمات الانتخابية (من كل من مضادات الحيوية ومبيدات الحشائش) والإنزيمات التى تعمل عليها، والجينات التى تتحكم فيها.

جدول (١٢-٢): بعض معلمات الغربلة screenable markers، والمعلمات الانتخابية selectable markers الشائعة الاستعمال فى دراسات التحول الوراثى النباتى (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

نوع المعلم	الجين	الإنزيم	العامل الانتخابى
غربلة	gus	Beta-Glucuronidase	
	lux	Luciferase (بكتيرى)	
	nos	Nopaline synthase	
	cat	Chloramphenicol acetyl transferase	
	luc	Luciferase (حشرة يَراعة)	
	m_2fpu	Green Fluoresent protein	
انتخاب	npt II	Neomycin phosphotransferase II	Kanamycin, G 418
	hmr	Aminoglycoside phosphotransferase IV	Hygromycin
	bar	Phosphinothricin acetyl transferase	Phosphinothricin (PPT)
	dhfr	Dihydrofolate reductase	Methotrexate
	epsps	5-enolpyruvyl- shikimate-3 phosphate synthase	Glyphosate
	cat	Chloramphenicol acetyl transferase	Chloramphenicol
	aad A	3″-Adenyly-transferase	Spectinomycin Streptomycin
	ahas	Acetylhydroxy acid synthase	Sulfonyl ureas, Imidazolinones
	hps	Hygromycinphospho-transferase	hygromycin

كذلك نقدم في جدولى (١٢-٣، و ١٢-٤) قوائم أخرى - نقلاً عن مصادر مختلفة - تظهر بها جينات معلمة انتخابية إضافية، فضلا عن بعض من تلك التى أسلفنا بيانها، ولكن بمزيد من المعلومات حول خصائصها ومصادرها.

ثانياً: معلمات الغربلة

تعرف معلمات الغربلة screenble (scorable) markers (وهى أحد أنواع الجينات المُخبرة أو الدالة على حدوث التحول الوراثى reporter genes) بأنها الجينات التى يمكن تقدير البروتينات التى تتحكم فى إنتاجها بطريقة مناسبة؛ حيث تستعمل فى إقامة الدليل على أن الجينات المنقولة قد تم التعبير عنها من عدمه؛ أى إنها تفيد فى غربلة الخلايا المحولة وراثيًا من خلال تعبيرها عن إنزيمات خاصة تنتج شكلاً مظهريًا مميزا

لا يقتصر استعمال تلك الجينات على التأكد من حدوث التحول الوراثى فقط، ولكنها يمكن أن تفيد - كذلك - فى عمل تقدير كمى تقريبى لدرجة التعبير عن الجين المنقول وبينما قد تميز تلك الجينات تمثيل الأوبين المحمول على الـ Ti plasmid، فإن معظمها تشفر لإنزيمات يسهل التعرف عليها وتقدير شدة نشاطها ولا تكون من بين الإنزيمات التى تنتجها طبيعيًا النباتات المتلقية للجينات الدالة.

يتضمن التحليل - عادة - إضافة المادة التى يعمل عليها الإنزيم؛ بما يسمح للإنزيم المنتج بواسطة الجين الدال للعمل عليها، ثم تقدير المنتج النهائى كميًا

ومن الناحية التالية يجب أن يكون من السهل التعرف على الجينات المخبرة أو الدالة وتقيمها، ويفضل أن يجرى ذلك باختبار لا يقضى على الأجزاء أو الأنسجة النباتية المستعملة، وألا يتواجد أى نشاط سابق مماثل لنشاط الـ reporter gene فى النبات الذى يُراد تحويله وراثيًا.

جدول (١٢-٣): بعض جينات المعلمات الانتخابية المستعملة فى التحولات الوراثية النباتية، ومصادرها، وطريقة فعلها (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

العامل الانتخابى	فعل الجين	مصدر الجين	رمز الجين	الجين المعلم الانتخابى
				Antibiotic resistance
Streptomycin	Antibiotic resistance	*Shigella flexneri*	*aad A*	Aminoglycoside adenyltransferase
Bleomycin	Antibiotic resistance	*E. coli*	*ble*	Bleomycin resistance
Sulphonamides	Antibiotic resistance	*E. coli*	*sul/dhps*	Dihydropteroate synthase
Methotrexate	Antibiotic resistance	Mouse	*dhfr*	Dihydrofolate reductase
Hygromycin Genticin (G418)	Antibiotic resistance	*E. coli*	*hpt/aph*IV/hyg	Hygromycin phosphotransferase
Kanamycin	Antibiotic resistance	*E. coli*	*npt* II/*neo*	Neomycin phosphotransferase II
Kanamycin Genticin (G418)	Antibiotic resistance	*Streptococcus faecalis*	*npt* III	Neomycin phosphotransferase III
				Herbicide resistance
Sulphonylureas	Herbicide resistance	*Arabidopsis* spp./ maize/tobacco	*als*	Acetolactate synthase
Glyphosate	Herbicide resistance	Petunia hybrida/ *Agrobacterium* spp.	*epsps/aro*A	Enolpyruvylshikimate phosphate synthase
Glyphosate	Herbicide resistance	*Achromobacter LBAA*	*gox*	Glyphosate oxidoreductase
Bialophos Glufosinate L-phosphinothricin	Herbicide resistance	*Streptomyces hygroscopicus/ S. viridochromogenes*	*bar/pat*	Phosphinothricin acetyltransferase
Cyanamide	Herbicide resistance	*Myrothecium verrucaria*	*cah*	Cyanamide hydratase

جدول (١٢-٤): بعض الجينات المعلمة الانتخابية المستعملة فى التحولات الوراثية النباتية ومصادرها، ونوع المقاومة التى تكسبها للنبات، وملاحظات أخرى بشأن الاختبارات المستعملة معها (عن Rathus & Birch ١٩٩١).

الجين	مصدره	المقاومة التى يوفرها	ملاحظات
Neomycin phosphotransferase II (NPT II)	*Tn5*	Kanamycin Neomycin G418 Paromomycin	المقاومة للكانامیسین فى بعض وحيدات الفلقة يمكن استعماله أيضًا كجين كمؤسس reporter gene
Hygromycin phosphotransferase (Hpt)	*E. coli*	Hygromycin B	لا يتوفر له اختبار إنزيمى
Mouse dihydrofolate reductase (DHFR)	*Mouse*	Methotrexate	لا يتوفر له اختبار إنزيمى
Bleomycin resistance	*Tn5*	Bleomycin	لا يعرف نشاطه الإنزيمى
Phosphinotricin acetytransferase (PAT)	*S. hygroscopicus* bar gene	Bialaphos	يتيسر الاختبار له
Acetolactate synthase (ALS)	*Mutant Arabidopsis ALS* gege	Sulphonylurea herbicides	يتيسر الاختبار له

ومع تلك المعلمات لا يكون هناك أى ضغط انتخابى على الخلايا أو النموات المتجدد تكوينها، حيث تؤخذ فقط أجزاء صغيرة من النسيج النباتى لأجل ملاحظة تعبير الجين المعلم فيها فمثلاً ينتج الجين gus إنزيمًا يعمل على مواد أولية داخل الخلايا لينتج راسبا أزرق اللون يمكن رؤيته بالعين المجردة وبالاعتماد على الجين المسئول عن إنتاج البروتين الفلورى الأخضر يظهر النسيج المحول وراثيًا بلون أخضر لدى تعريضه للأشعة فوق البنفسجية (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

ولعل أكثر معلمات الغربلة استعمالاً وشيوعًا من بين تلك المشار إليها أعلاه الجين GUS، الذى يمكن تقدير نشاطه كميًّا باستعمال إما التحاليل الفلوروماترية fluorometric، وإما التحاليل الاسبكتروميترية spectrophotometric، وكلاهما رخيص وبسيط (عن Rathus & Birch ١٩٩١).

تعد أكثر الجينات الدالّة أو المخبرة استعمالاً الجين β-glucuronidase (اختصارًا: GUS) الذى حُصل عليه من *Escherichia coli*، كما يستخدم كثيرًا أيضًا الجينات neomycin phosphotransferase (اختصارًا: NPT II)، و Chloramphenicol acetyltransferase (اختصارًا: CAT)، و luciferase. وتوجد مجموعة أخرى من الجينات الدالّة أقل قبولاً، مثل: phosphinothricin acetyltransferase، و Catechol oxydase، و gentamycin acetyltransferase، و Cytosine deaminase، و β-galactosidase.

يسمح الجين GUS ليس فقط بتقدير قوة الجين المؤسس أو المعزز promoter gene، ولكنه يسمح – كذلك – بإجراء تحليل هستولوجى للتعبير الجينى فى أنواع خاصة من الخلايا أو الأنسجة فى النباتات المحولة وراثيًا.

ومن عيوب الجينات الدالّة التى سبقت الإشارة إليها – باستثناء جين الـ luciferase – أن المواد التى تعمل عليها الإنزيمات التى تنتجها تلك الجينات يجب أن تخترق الأنسجة، بما يعنى استبعاد التحليل الهستولوجى فى الكائن الحىّ in vivo (عن Herbers & Sonnewald ١٩٩٨).

ويعد الجين cat أقلها استخدامًا فى مجال التحولات الوراثية النباتية، ولكنه يستعمل على نطاق واسع فى مجال الدراسات على الحيوانات (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الجين بيتا جلوكورونيديز (gus)

ربما كان الجين بيتا جلوكورونيديز β-glucoronidase أكثر الجينات المُخبرة reporter genes استعمالاً فى نواقل vectors التحولات الوراثية، ويرجع ذلك إلى مزاياه العديدة، إذ يمكن تقييمه بدرجة عالية من الحساسية والدقة باستعمال طرق سريعة، وسهلة، ولا تتطلب أية إشعاعات. كما يمكن استعماله للحصول على نتائج كمية (عن مستوى التعبير الجينى)، ونوعيته (عن مكان التعبير الجينى). كذلك لا يوجد أى نشاط طبيعى لهذا الإنزيم – أو ربما قد يوجد له نشاط منخفض للغاية – فى مختلف الأنسجة النباتية، ربما باستثناء الأنسجة المتخصصة فى التكاثر الجنسى.

عُزل الجين GUS (وهو الخاص بالإنزيم β-glucuronidase) من *E. coli*، وهو الإنزيم الذى يحول مادة بادئة عديمة اللون (هى 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide) إلى مادة ذات لون أزرق قاتم. وبذا .. فإن الخلايا التى يُعبَّر فيها عن الـ GUS تصبح زرقاء إذا ما تعرضت للمادة البادئة، بما يجعل التعرف على الجين أمرًا غاية فى البساطة. ليس هذا فقط، بل إن النباتات الكاملة المحولة وراثيًا تصبح بلون أزرق قاتم إذا ما غمست فى المادة البادئة. هذا .. إلاّ أن هذا الاختبار يعد مدمرًا للأنسجة النباتية التى تُخضع له، بما يعنى عدم استمرارية الخلية أو النسيج النباتى الذى يتم التحقق من تحوله وراثيًا (عن Gray وآخرين ٢٠٠٥).

جين اللوسيفيريز

يشفر جين اللوسيفيريز luciferase (اختصارًا luc) – المتحصل عليه من ذبابة البراعة، أو الحُباحب firefly (*Photinus pyralis*) – لإنزيم يعمل على أكسدة الـ D-luciferin بطريقة تعتمد على الـ ATP، يترتب عليها انطلاق الضوء بصورة سريعة للغاية، واكتساب النسيج لونا أصفر لدى معاملته بالـ luciferin.

كذلك تتوفر جينات لوسيفيريز أخرى من مصادر بكيترية، مثل الجينين luxA، و luxB بالبكتيريا *Vibrio harveyi*، وتستعمل بالفعل فى بعض حالات التحولات الوراثية، وهى تعمل على أكسدة الألدهيدات الدهنية ذات السلاسل الطويلة، مما يؤدى إلى انطلاق الضوء كذلك.

جين الكلورمفينيكول أسيتيل ترانسفيريز

يستعمل جين الكلورمفينيكول أسيتيل ترانسفيريز chloramphenicol acetyltransferase كـ reporter gene فى خلايا الثدييات، وبدرجة أقل فى حالات التحول الوراثى النباتى.

جين البروتين ذو الفلورة الخضراء

يعد اختبار الـ gus مدمرًا للخلايا والأنسجة النباتية التى تستعمل فى الاختبار، كما أن مركب الـ luciferin المستعمل فى اختبار الـ luciferase يعد باهظ الثمن.

ولهـذه الأسـباب .. فـإن الـبروتين ذو الفلـورة الخضـراء green-fluoresent protein (اختصارًا: GFP) المتحصل عليه من قنديل البحر jellyfish (واسمه العلمـى *Aequorea victoria*) يحظـى باهتمـام متزايـد؛ فنظـرًا لأنـه لا يتطلـب سـوى أشـعة زرقـاء أو فـوق بنفسجية عند طول موجى ٤٨٠ نانوميتر وأكسجين – ولا يحتاج لأى مواد أولية أخـرى إضافية – فإنه يفضل كثيرًا استعماله كمعلم حيـوى أثنـاء النمـو النبـاتى؛ حيـث يظهـر البروتين باستشعاع أخضر اللون. ولقد أظهرت الدراسات أن الـ GFP كان مراسـلاً جيـدًا للإصابة الفيروسـية عندما استعمل انـدماج بـين فـيرس إكـس البطـاطس والـ GFP أثنـاء تجـارب عـدوى النباتـات. وبسـبب التركيـزات العاليـة للفـيرس .. فقـد أمكـن بالـ epifluoresence التعرف – ميكرسكوبيًّا – على الخلايـا المفـردة التـى أصـيبت بـالفيرس (عن Herbers & Sonnewald ١٩٩٨، و Gray وآخرين ٢٠٠٥).

هـذا .. ويلخـص جـدولا (١٢–٥)، و(١٢–٦) أكثـر جينـات الغربلـة اسـتعمالاً، ومصادرها، وخصائصها.

وتجدر الإشـارة إلى أن المعلمات الجزيئية – التى قدمنا لها بالتفصيل فى فصـل سـابق – تستعمل – كذلك – كوسـيلة فعالة للغربلة؛ حيث يـدل تواجـدها علـى تواجـد الجـين أو الجينات المرغـوب فيهـا المرتبطـة بهـا. ونقـدم فـى جـدول (١٢–٧) مزيـدًا مـن تلـك المعلمات الجزيئية التى ترتبط بعدد من جينات المقاومـة لأمثلـة متنوعـة مـن الفطريـات، والنيماتودا، والفيروسـات، والبكتيريا المرضة لبعض المحاصيل الزراعية.

الجينات المؤسسة أو المعززة

يستعمل مصطلح الجين المؤسس أو المعزز promoter gene فى وصـف الجينـات التـى تؤسس للتعبير الجينى (للجين المعنى بعملية التحول الوراثى) أو تعزز ظهوره فى أنسجة معينة، أو فى مراحل عمرية معنية دون غيرها.

إن أكثر الجينات المؤسسة أو المعززة شيوعًا هى تلك التـى حصـل عليهـا مـن الـ T-DNA الخاص بالبكتيريا *Agrobacterium*، ومن الفيروسـات النباتيـة، وترجـع أهميتهـا إلى قدرتها على قصر التعبير الجينى على أى نسيج نباتى معـين دون أن يظهـر فـى أى

نسيج آخر، وإلى قوتها وإمكان استعمالها مع عديد من الأنواع التى يُرغب فى تحويلها وراثيًا

جدول (١٢-٥) بعض جينات الغربلة المستعملة فى عمليات التحول الوراثى النباتى (عن Rathus & Birch ١٩٩١)

الجين	المصدر	نوع الاختبار	ملاحظات
Nopaline synthase (NOS)	T-DNA	Paper chromatography	لا يقدر كميًا
Octopine synthase (OCS)	T-DNA	Paper chromatography	لا يقدر كميًا
Neomycin	Tn5	Phosphorylation (^{32}P)	يمكن استخدامه كذلك كمعلم انتخابى
Phosphotrans-ferase II (NPT II)		Autoradiography	يصعب تقديره كميًا
		ELISA	يقدر كميًا
Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)	Tn9	Acetylation (^{14}C) (autoradiography scintillation counting)	يقدر كميًا يوجد نشاط طبيعى للجين فى بعض الأنواع
B-glucuronidase (GUS)	*E. coli*	Fluorometric	يقدر كميًا بسهولة
		Spectrophotometic Histochemical	يمكن تحديده موضعيًا
Firefly luciferase (LUC)	*Photinus*	Light emission	من السهل تقديره كميًا
	pyralis	Luminometer	يمكن تحديده موضعيًا
Bacterial luciferase (LUX)	*Vibrio*	Light emission	من السهل تقديره كميًا
	harveyi	Luminometer	
LacZ	E. coli	β-galactosidase activity	لا يمكن تقديره فى بعض الأنواع بسبب وجود نشاط عال للـ gus فيها
		Fluorometic Histochemical	
Anthocyanin biosynthesis (Lc)	Maize	Cell pigmentation (visual)	يمكن تحديد الخلايا المحولة وراثيًا كميًا
Plant viral genomes	Tobacco mosaic virus	Inclusion bodies Coat protein	تشكل الإصابة بالفيرس عائقًا أمام الاستدلال على التحول الوراثى

جدول (١٢-٦): بعض جينات الغربلة المستعملة في عمليات التحول الوراثي (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

جين الغربلة	رمز الجين	مصدر الجين	اختبار التعرف والتقدير
β-Glucuronidase	*Gus/uidA*	*E. coli*	Fluorimetric (quantitative) or histochemical (*in situ*), non-radioactive
Green fluorescent protein	*gfp*	*Aequorea victoria* (jellyfish)	Fluorescence, non-destructive
Chloramphenicol acetyltransferase	*cat*	*E. coli*	Radioactive assay of plant extract, sensitive, semi-quantitative
Luciferase	*luc*	*Photinus pyralis* (firefly)	Luminescence
Luciferase	*luxA, luxB*	*Vibrio harveyi*	Luminescence

وأكثر الجينات المؤسسة استعمالها هي التي تمكن من حدوث التعبير الجيني في معظم الأنسجة النباتية، وهي التي يُشار بأنها قوامية أو تكوينية constitutive، ويتحصل على أهمها من فيرس موزايك القنبيط cauliflower mosaic virus (اختصارًا: CaMV) وهو فيرس مزدوج الخيط النووي، ويعرف باسم CaMV 35S promoter (عن Herbers & Sonnewald ١٩٩٨)، وهو الذي أسلفنا الإشارة إليه كجين انتخابي كيميري نقلاً عن Gardner وآخرين (١٩٩١)

ومن أهم الجينات المؤسسة والأنسجة التي تعزز التعبير فيها عن الجينات المنقولة، ما يلي:

الجين المؤسس أو المعزز promoter	النسيج التي يُعَزز التعبير الجيني فيه
CaMV 35S (من فيرس موزايك القنبيط)	قوامي أو تكويني constitutive (جميع الأنسجة)
rolC (من الأجروباكتيريم)	خاص بنسيج اللحاء والبرانشيمية الوعائية
ST-LS1	الخلايا المحتوية على البلاستيدات الخضراء
(B33) Patatin Class I	خاص بالدرنات
ADP pyrophosphorylase	الجهاز الثغري stomata
rbcS	الخلايا المحتوية على البلاستيدات الخضراء
cab	الخلايا المحتوية على البلاستيدات الخضراء

جدول (١٢-٧): أمثلة لعدد من المعلمات الجزيئية التى وجد أنها ترتبط بجينات معينة لمقاومة الأمراض فى عدد من المحاصيل الزراعية (عن Swarup & Swarup ١٩٩٣)

النوع المحصولى	المسبب المرضى	جين المقاومة	المعلم الجزيئى المرتبط
فطريات			
الطماطم	*Stemphylium* sp.	*Sm*	RFLP
	Fusarium oxysporum race 1	*I1*	RFLP
	F. o. race 2	*I2*	RFLP
	F. o. race 3	*I3*	*Got-2*
الذرة	*Puccinia sorghi*	*Rpl*	RFLP
	Helminthosporium Carbonum race 1	*Hml*	Cloned gene
	H. turcicum race 1	*Htl*	RFLP
الخس	*Bremia lactucae*	*Dm3* *Dm5/8*	RFLP
النيماتودا			
الطماطم	*Meloidogyne incognita*	*Mi*	Aps-1 RFLP
البطاطس	*Globodera rostochiensis*	*Gro-1*	RFLP
بنجر السكر	*Heterodera schachtii*		RFLP
الفيروسات			
البطاطس	PVX	*Rx1* *Rx2*	RFLP
الذرة	MDMV-A	*Mdml*	RFLP
الطماطم	TMV	*Tm-1*	RFLP
		Tm-2a	RFLP
البكتيريا			
الطماطم	*Pseudomonas syringoe* pv. Tomato	*Pto*	RFLP
الأرز	*Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae*	*Xa21*	RFLP

ومن بين قوائم الجينات المؤسسة promoters الأخرى، ما يلى (عن .Prg. Bot - المجلد ٦٢ لعام ٢٠٠١ – صفحة ١١٩):

اسم الـ promoter أو الجين	المصدر	الخلايا أو الأنسجة التى يُعَزز التعبير الجينى فيها
Itpl	التبغ	البشرة
CHS15	الفاصوليا	الأزهار والقمة النامية الجذرية
0.3 kb fragment of AGPase	البطاطس	الخلايا الحارسة
PCNA	الأرز	الميرستيم
Sh	الذرة	اللحاء
fragment of RTBV	الأرز	اللحاء
LAT52	الطماطم	حبوب اللقاح
Puroindolin-b	القمح	البذور
TA29	التبغ	الخلايا الطلائية tapetum

اختبارات التأكد من حدوث التحول الوراثى

يتم التأكد من حدوث عملية التحول الوراثى فى النباتات المتلقية للجينات الغريبة بعديد من الطرق التى تعتمد على الناقل المستعمل فى عملية التحول الوراثى.

ومن بين الطرق المستعملة فى التحقق من حدوث التحول الوراثى من عدمه، ما يلى:

١ – ملاحظة الشكل المظهرى.

تعد طريقة ملاحظة الشكل المظهرى أبسط طرق التحقق من التحول الوراثى إذا ما أظهرت النباتات المحولة وراثيًّا الشكل المظهرى المتوقع للجين المنقول. كما يُعد النبات محولاً وراثيًّا إذا أمكنه النمو فى وجود تركيز عالٍ من مركب انتخابى، مثل مضادات الحيوية ومبيدات الحشائش. وإذا ما استعمل فى عملية التحول الطراز البرى من *Agrobacterium rhizogenes* فإن النباتات المحولة وراثيًّا تنتج جذورًا دقيقة بكثرة، ولا تظهر استجابة للجاذبية الأرضية، وتكون أوراقها مجعدة.

٢ – التحاليل الإنزيمية:

تستخدم بعض التحاليل الإنزيمية لعلمات جينية (مثل nos، و cat) لاختبار تعبير

دنا غريب فى النسيج المحول وراثيًا، وتستخدم فى هذا الاختبار الأنسجة النباتية النشطة فى النمو .

٣ - تحليل الـ PCR:

يقوم الـ Polymerase Chain Reaction بتضخيم (إكثار) تتابعات الدنا بين بادئات مخلقة محددة. تستعمل مجموعة من البادئات primers (بادئات تقدمية forward primers وأخرى عكسية reverse primers) الخاصة بالجين المنقول لتضخيم (إكثار) تتابعات هذا الجين - بصورة خاصة - من بين كل الدنا الجينومى المعزول من نسيج النبات المحول وراثيًا ويمكن أن يدل ناتج الـ PCR على وجود أو غياب الجين المراد نقله، إلا أن الـ PCR يُضَخِّم جزءًا فقط من هذا الجين، ولذا .. فإن هذا الاختبار يعد مناسبًا كاختبار مبدئى للتحول الوراثى، ولكنه قد يعطى نتائج موجبة تكون خاطئة بسبب احتمالات وجود تلوث بالدنا. هذا .. ولا يعطى اختبار الـ PCR أى نتائج تتعلق بعدد نسخ الجين التى تم نقلها transgene copy number، ومواقع اندماجها فى جينوم النسيج المحول وراثيًا، أو مستوى تعبير هذا الجين.

٤ - تحليل الـ Southern Blot:

يعد تهجين الـ Southern blot طريقة عالية الكفاءة لنقل الدنا من جل الأجاروز إلى الأغشية قبل تهجينها (باستعمال مجسات نشطة إشعاعيًا أو غير نشطة). تعتبر هذه التقنية حساسة وتستعمل فى التعرف على الجين المنقول فى الدنا الجينومى دون الحاجة إلى أى تضخيم لهذا الجين.

ويعطى تحليل الـ Southern Analysis بيانات عما يلى:

أ - الاندماج الثابت للجين المنقول فى الجينوم.

ب - عدد نسخ الجين التى تم نقلها.

جـ - عدد مواقع الاندماج.

هذا إلاّ أن هذه الطريقة لا تعطى أى نتائج بخصوص مدى تعبير الجين المنقول.

٥ - تحليل الـ Western Blot:

يتضمن هذا الاختبار التعرف على البروتينات التى تنتجها الجينات المنقولة فى

النباتات المحولة وراثيًا. وهو يعد اختبارًا يمكن الاعتماد عليه في تحديد درجة التعبير الجيني للجين المنقول، حيث يكون من السهل تقدير مستوى التعبير الجيني بحساب كمية البروتين التي ينتجها الجين المنقول كنسبة من البروتين الذائب الكلي بالنبات.

٦ - تحليل النسل Progeny Analysis:

يمكن التعرف على وراثة الجين المنقول بسهولة بتلقيحه مع نبات لم يحول وراثيًا ودراسة الانعزالات في الأجيال الانعزالية وكذلك في عشائر التلقيحات الرجعية (Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الخصائص التي تختلف فيها النباتات المحولة وراثيًا عن غيرها

إن أهم مما تتميز به النباتات المحولة وراثيًا من خصائص تختلف بها عن سواها، ما يلي:

١ - المقاومة للمضادات الحيوية:

تعتمد معظم طرق التحول الوراثي على إدماج جين انتخابي معلم ضمن الـ gene construct المستعمل في نقل الجين المرغوب فيه. ولعل أكثر الجينات المعلمة استعمالاً الجين neomycin phosphotransferase (اختصارًا: nptII)، الذي يكسب الخلايا الحاملة له مقاومة للمضاد الحيوي كاناميسين kanamycin. ويعد الجين الانتخابي المعلم ضروريًا لأن نسبة ضئيلة فقط من الخلايا التي تخضع لإجراءات التحول الوراثي هي التي تصبح محولة. ويكسب الانتخاب على بيئة زراعة تحتوي على الكاناميسين ميزة انتخابية لتلك الخلايا التي حدث فيها التحول الوراثي بالـ gene construct، والتي تكون - بالتالي - مقاومة للكاناميسين.

يستمر جين المقاومة للكاناميسين في التعبير عن ذاته في النباتات المحولة وراثيًا، ويظل متواجدًا في أي صنف يتم تطويره منها. ويتوفر حاليًا عديد من الأدلة على أن تواجد جين المقاومة للكاناميسين في المحاصيل المحولة وراثيًا لا يحمل معه أية مخاطر على صحة الإنسان أو البيئة. وعلى الرغم من ذلك، فقد حاول العلماء التخلص من هذا الجين بطرق متنوعة، منها إجراء تحويلان وراثيان في آن واحد باستعمال اثنان من

الـ gene constructs يضم أحداهما الجين الانتخابى المعلم، ثم التخلص منه بعد ذلك بالتلقيح الرجعى للنباتات المحولة وراثيًا، حيث يمكن الحصول على انعزالات تخلو من الـ gene construct المحتوى على الجين المعلم الانتخابى.

٢ - تباين عدد نسخ الجين المنقول ومواضعها فى جينوم النبات:

تتباين أعداد نسخ الجينات المنقولة فى النباتات المحولة وراثيًا فى جميع تقنيات الهندسة الوراثية فعلى الرغم من شيوع وجود نسخة واحدة من الدنا المنقول فى النباتات المحولة وراثيًا، إلاّ أن وجود أكثر من نسخة من الجين يعد أمرًا عاديًّا، ويبلغ المتوسط ثلاثة نسخ، إلاّ أن العدد قد يصل إلى ٢٠ أو ٥٠ نسخة فى بعض النباتات

أما المواقع التى تستقر فيها نسخ الجين المنقول فى الهيئة الكروموسومية للنبات المحول وراثيًّا فيبدو أنها تكون عشوائية تمامًا، وفى أى كروموسوم، وفى أى موقع من أى منها

٣ - تباين التعبير عن الصفات (الجينات) المنقولة وتباين مدى ثباتها

يمكن أن يختلف مدى التعبير عن الصفات (أى الجينات) المنقولة من نبات محول وراثيًّا لآخر ولقد وجدت أحيانًا علاقة إيجابية بين مدى هذا التعبير وعدد نسخ الجين المنقول التى حدث لها دمج فى الهيئة الكروموسومية للنباتات المحولة وراثيًّا، لكن تلك العلاقة لم تظهر فى دراسات أخرى

كما وجد أحيانًا أن التعبير عن الصفات المنقولة لم يكن ثابتًا، حيث انخفض تدريجيًا

وجدت كذلك أدلة على حدوث تفاعلات بين الجينات المختلفة المنقولة، حيث يمكن لتتابعات الدنا فى أحد الـ constructs أن تتعارض مع تعبير جينات فى constructs أخرى ولقد أظهر التحليل الجزيئى للـ promoters الخاصة بالجينات المنقولة التى قلّ فعلها أو توقف . أظهر غالبًا حدوث methylation للسيتوزين (عن Dale وآخرين ١٩٩٣).

هذا .. ولا يشترط أبدًا أن يعطى خيط الدنا الواحد – المنقول بطرق الهندسة الوراثية – شكلاً مظهريًا واحدًا فى كل مرة ينقل فيها، حتى ولو كان نقله إلى نفس النوع النباتى، حيث يلاحظ تواجد درجة عالية من التباين المظهرى بين حالات التحول الوراثى المختلفة التى تتضمن نفس الجين. وأحيانًا تُظهر الأفراد المحولة وراثيًّا تأثيرًا مظهريًّا للجين المنقول فى أول الأمر، إلاّ ن هذا التأثير قد يختفى فى مراحل النمو اللاحقة، أو فى الأجيال التالية لجيل التحول.

وقد أرجعت التباينات المظهرية فى النباتات المحولة وراثيًّا إلى الأسباب التالية:

أ – حدوث طفرات فى الدنا المنقول أثناء عملية النقل ذاتها، مثل حالات النقص وإعادة الترتيب فى الدنا.

ب – وجود تباين فى عدد نسخ الجين المنقول (transgene copy number)، علمًا بأن التعبير الجينى غالبًا ما ينخفض بزيادة عدد النسخ المنقولة من الجين، إلى درجة احتمال حدوث وقف كامل لفعل الجين.

جـ – حدوث تفاعلات بين جينية.

د – حدوث تباينات مزارع.

هـ – حدوث تأثير موضعى position effect كروموسومى (عن Albert & Ow ١٩٩٨).

إن الوسيلة العملية لتجنب المشاكل الخاصة بالتباينات بين النباتات المحولة وراثيًّا وعدم ثباتها الوراثى، وتباينات مزارع الأنسجة (التى تظهر غالبًا بسبب حتمية اللجوء إلى مزارع الأنسجة لإجراء بروتوكولات الهندسة الوراثية) .. تكون بإنتاج أعداد كبيرة من النباتات المحولة وراثيًّا (يزيد عن المائة)، وانتخاب تلك التى تكون بشكل مظهرى مرغوب فيه. وباستثناء النباتات الخضرية التكاثر فإنه يكون عادة من المفضل التعرف على تراكيب وراثية حدث بها دمج واحد فقط للـ gene construct (أى تكون قد تلقت نسخة واحدة من الجين المنقول)؛ لكى تكون وراثتها بسيطة ويمكن التنبؤ بانعزالاتها فى الأجيال الانعزالية التالية (عن Dale وآخرين ١٩٩٣).

تحديات التحول الوراثى والتعبير الجينى فى النباتات المحولة وراثيًا

إن المتطلب الأساسى لنجاح أى عملية تحول وراثى هو ثبات التعبير عن الجين المنقول، الأمر الذى يعتمد على عديد من العوامل، منها ما يلى:

١ – عدد نسخ الجين المنقول وتركيبها.

٢ – المنطقة الكروموسومية التى حدث فيها اندماج للجين المنقول.

٣ – التركيب الكروماتينى لتلك المناطق الكروموسومية وحالة الـ methylation بها

٤ – قوة وخصوصية الـ promoter المصاحب للجين

٥ – أجزاء الدنا المنقول التى يمكن أن تصبح تتابعات ممكنة لحدوث الـ methylation، أو لزيادة تحلل الرنا الرسول (عن Meyer ١٩٩٥).

إن الجينات المنقولة بطرق الهندسة الوراثية قد تُظهر انعزالات مندلية وقد لا تُظهر، وقد يتأثر التعبير الخاص بها بموقع اندماجها فى جينوم النبات المحول وراثيًا، وبتركيب الدنا المنقول. وقد تصبح الجينات المنقولة غير ثابتة عبر الأجيال، وحسب الخلفية الوراثية للنبات المحول وراثيًا، والظروف البيئية، وقد يكون لها تأثيرات سلبية معنوية على الجينات الأخرى الأصلية فى النبات (عن Zhong ٢٠٠١).

هذا .. ولا تتوفر إلى الآن وسيلة لضبط عملية التحول الوراثى فى أجزاء معينة من الهيئة الكروموسومية للنبات المحول؛ فالمسألة كلها اعتباطية، حيث ينتهى الجين المنقول فى أى موضع من أى كروموسوم؛ الأمر الذى يترتب عليه ظهور حالات عديدة للتأثير الموضعى position effect.

فمثلاً . إذا حدث اندماج للجين المنقول فى موضع لا يسمح فيه تركيب الكروماتين بعملية الاستنساخ فإنه يبقى دونما تعبير، أى يبقى silent.

كذلك قد تسمح الاختلافات الموضعية فى تركيب الكروماتين للـ reporter gene بالتعبير عن ذاته بينما لا تسمح بذلك للجينات الخرى المجاورة له فى الـ gene construct، بما فى ذلك الجين المنقول (عن Kahl وآخرين ١٩٩٤).

وقد تناول Finnegan & McElroy (١٩٩٤) بالشرح الوسائل التى "تحارب" بها

النباتات الجينات الدخيلة المنقولة إليها بطرق الهندسة الوراثية وتوقف نشاطها – الأمر الذى يحدث فى أحيان كثيرة – مع التركيز على كل من حالات: الـ DNA methylation، والـ trans-inactivation، والـ co-suppression.

التعبير الجينى المؤقت والتعبير الدائم فى النباتات المحولة وراثياً

بعد النقل الناجح لجين غريب إلى النوع المراد تحويله وراثيًا، فإنه ليس من الضرورى أن يندمج هذا الجين دائمًا مع جينوم الخلايا المتلقية له. وفى تلك الحالات فإن الجين المنقول لا يعبر عن ذاته إلاّ بصورة مؤقتة، حيث تتناقص قدرته على التعبير بصورة تدريجية إلى أن تختفى فى نهاية الأمر. وبطبيعة الحال فإن تلك الحالة لا يكون مرغوبًا فيها فى عمليات التحول الوراثى. وتفيد الاختبارات التى تجرى بعد ٢٤–٤٨ ساعة من نقل الدنا الخاص بالـ reporter genes فى التقييم السريع لعملية التحول ومدى ملاءمة الـ plasmid constructs وقد أثبتت تلك الاختبارات – كذلك – أنها ذات فائدة كبيرة فى الحصول على معلومات بشأن وظائف الجينات ونظام عملها.

وعندما يندمج الجين المنقول بصورة ثابتة مع جينوم النوع المتلقى له وتعبيره عن ذاته بصورة دائمة وثابتة، فإن ذلك يطلق عليه اسم stable gene expression.

توقف التعبير الجينى فى النباتات المحولة وراثياً

تُوَرَّث الجينات المنقولة – التى تدخل فى إندماج ثابت بجينوم النباتات المحولة وراثيًا – تُوَرَّث كأى صفة مندلية، ولكن يحدث فى كثير من الأحيان أن يضعف ظهور الصفة الجديدة المكتسبة بصورة تدريجية فى نسل النباتات المحولة وراثيًا جيلاً بعد جيل، علمًا بأن هذا الفقد فى التعبير الجينى – والذى يطلق عليه اسم gene silencing – لا يتضمن فقدًا لهذا الجين، وإنما مجرد حدوث وقف لنشاطه.

ومن أهم مسببات توقف نشاط الجينات المنقولة، ما يلى:

١ – حدوث مثلمة methylation لتتابعات الدنا.

٢ – العوامل البيئية.

٣ – التثبيط الناشئ عن نقل عدة نسخ من الجين المنقول.

٤ – تلف الكروموبلاستيدات، فيما يعرف باسم transinactivation.

هذا.. وقد يحدث التوقف للتعبير الجينى أثناء الاستنساخ transcriptional silencing، أو بعده post-transcriptional silencing

يحدث التوقف أثناء الاستنساخ نتيجة لحدوث مثلمة methylation للـ promotor region الخاصة بالجين. ويؤدى إدخال عدة نسخ من الجين أثناء عملية التحول الوراثى إلى حدوث مثلمة زائدة. وقد يحدث الاندماج للجين المنقول فى مناطق من الكروموسوم تكثر فيها المثلمة بشدة.

أما توقف الفعل الجينى الذى يحدث بعد الاستنساخ فإنه يحدث نتيجة للمثلمة فى منطقة الشفرة الوراثية، ولكنه لا يؤثر مباشرة على عملية الاستنساخ.

ويمكن الحصول على تعبير ثابت وعند المستوى المرغوب فيه من خلال برنامج للتربية تنتخب فيه عشائر جديدة بالصفات المرغوبة بعد تهجين عدة سلالات محولة وراثيًا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

يبدو أن التباينات المظهرية ووقف الفعل الجينى gene silencing – للجين المنقول – فى النباتات المحولة وراثيًا.. يبدو أنها تُحَفَّز بظروف مزارع الأنسجة التى تجرى فيها عمليات التحول الوراثى، كما يبدو أنها تعتمد – جزئيًا على الأقل – على كل من المحفز (الـ promoter)، والـ coding region. وقد يؤدى التماثل homology بين أجزاء من الجين المنقول وجينات أخرى فى الهيئة الوراثية للنبات الذى يُراد تحويله وراثيًا.. قد يؤدى إلى وقف فعل الجين المنقول وحده أو حتى – كذلك – وقف فعل الجين المماثل له جزئيًا فى النبات. ويمكن أن يتغير وقف الفعل الجينى خلال مختلف مراحل النمو بعد الإنبات، كما يمكن أن يتحور بعوامل بيئية غير محددة. وجدير بالذكر أن كثيرًا من حالات وقف الفعل الجينى يمكن أن تنعكس، مما يؤدى إلى حدوث الفعل الجينى.

وكما أسلفنا بيانه.. فإنه يميز بين نوعين من وقف الفعل الجينى: أثناء النسخ الجينى transcriptional، وبعد النسخ post-transcriptional. ويفترض أن وقف الفعل

الجينى أثناء النسخ يرتبط بقرب الجين المنقول من منطقة غير نشطة أصلاً من الكروموسوم، وليس مع مقدار الرنا الذى يتم تجهيزه، حيث قد تمتد عمليات المثلمة من تلك الجينات الموقوف عملها أصلاً إلى الجينات المنقولة ضمن منطقتها. أما فى حالات وقف الفعل الجينى بعد النسخ فإن الرنا يُنتج بالمستويات المتوقعة، ولكنه لا ينتقل إلى حيث يؤدى عمله، أو قد ينتقل ولكنه يتحلل سريعًا فى السيتوبلازم (عن Caplan وآخرين ١٩٩٨).

إن من أهم الظواهر التى ترتبط بتعطيل عمل الجينات gene silencing هى أن هذا التعطيل يرتبط بدرجة التغير فى موقع الجين من الكروموسوم؛ فنجد أن الجينات التى توجد فى مواقعها الأصلية تكون أقل عرضة للتعطيل عن تلك التى تكون قد دمجت عشوائيًّا فى عائل جديد، أو انتقلت إلى جوار منطقة كروماتين خامل heterochromatin، أو إلى منطقة يوجد بها مثلمة شديدة (عن Caplan وآخرين ١٩٩٨).

تنتج الجينات المعطلة عن العمل (الصامتة) silent genes قدرًا من الرنا أقل من المتوقع، أو لا تنتجه على الإطلاق، وقد تنتجه فى بعض الخلايا دون غيرها. وفى بعض الأحيان يتوقف النسخ حينما تدمج فى الجينوم نسخة أخرى من الجين أو جزءًا منه.

وفى حالات أخرى يرتبط مستوى النسخ - أو يُفترض ارتباطه - مع قرب الجين المنقول من منطقة من الكروموسوم تكون صامتة بطبيعتها.

كذلك يعتقد على نطاق واسع أن دمج الجين المنقول فى منطقة من الكروموسوم ممثلمة methylated بشدة - أو قريبًا منها - يؤدى إلى ضعف الاستنساخ الجينى.

وفى أحيان كثيرة يبدأ الجين المنقول فى التعبير عن ذاته بصورة عادية، ثم يتوقف التعبير بعد نحو ٢-٧ أسابيع من إنبات البذور، كما لو كانت كميات الرنا الرسول أو البروتين المخلق المسئول عنهما الجين المنقول .. كما لو كانت قد تجاوزت حدود قدرات النمو الطبيعى. وفى أحيانٍ أخرى كثيرة يستمر استنساخ تلك الجينات - التى تكون صامتة مظهريًّا (أى لا تعبر عن ذاتها) - يستمر استنساخها فى النواة، ولكن لا يصل إلى السيتوبلازم سوى القليل جدًّا من الرنا الرسول (عن Caplan وآخرين ١٩٩٨).

الدنا المتحرك ودوره فى وقف التعبير الجينى

تحدث بعض التغيرات الكروموسومية وعدم الثبات الوراثى فى الهيئة الكروموسومية بفعل عديد من حالات إعادة التوزيع وإعادة الترتيب الكروموسومى وكذلك حالات الطفرات وتحدث تلك التغيرات الطفرية وإعادة الترتيب للدنا - خاصة - بواسطة دنا متحرك يورث مع الجينوم، مثل البلازميدات plasmids (فى البكتيريا وعضيات الخلية)، والفيرونات virons، والترانسبوزونات transposons، وتشترك جميع نوعيات الدنا المتحرك فى بعض الصفات المشتركة

يُطلق على الترانسبوزونات transposons (وهى الـ transposable elements) - كذلك - اسم الجينات القافزة jumping genes، وهى قطع دنا محددة قادرة على الانتقال مباشرة إلى مواضع أخرى من الهيئة الكروموسومية وتعد تلك التغيرات فى المواقع - بطبيعتها - حالات نادرة ولكن يمكن أن يزداد معدل الانتقالات بصورة درامية، وخاصة حينما يتعرض النبات لعوامل مطفرة أو لعوامل الشدّ البيئى. وعلى خلاف الطفرات العاملية .. فإن نشاط الترانسبوزونات يؤثر على جزء كبير من الجينوم

تقود حركة العناصر المتحركة إلى إحداث نوعيات مختلفة من الطفرات، منها الإيلاج أو الإقحام insertion، والاقتضابات deletions، والازدواجات duplications، والانقلابات inversions، والانتقالات translocations، وإعادة الترتيب rearrangements فى التسلسل الجينى

ويمكن للترانسبوزونات أن تعدل من نشاط الجينات أو تتحكم فى وظائفها بالسماح لها بالتعبير أو بوقف نشاطها، كما يمكن لها أن تغير من وظائف الجينات نتيجة لوضعها فى مواضع تنظيمية جديدة

ولقد أمكن التعرف على العناصر المتنقلة تلك فى كل الكائنات الحية التى بحث فيها عنها، وهى يمكن أن تحتل ما بين ٥٪، و ٢٠٪ من الهيئة الوراثية للفرد، وكان أول ملاحظة لها فى الذرة بواسطة باربرا ماكلنتوك Barbara McClintock فى عام ١٩٤٨، وأطلقت عليها حينئذ - اسم العناصر المتحكمة controlling elements بسبب تأثيرها الواضح فى التعبير الجينى

وبعد نحو ٤٠ عامًا من اكتشاف ماكلينتوك لتلك العناصر أمكن عزل أول عنصر منها من نبات الذرة، وأطلق عليه اسم المُنشِّط activator، وتم تعريفه على المستوى الجزيئى. وكانت عناصر مماثلة قد اكتشفت فى البكتيريا فى الستينيات من القرن الماضى، وتتابع بعد ذلك اكتشاف العناصر المتنقلة فى عدد من الكائنات مثل الفطريات (الخميرة) وحشرة الدروسوفيلا، والإنسان. ويعتقد الآن - على نطاق واسع - أن هذه العناصر المتنقلة تلعب دورًا أساسيًّا فى التطور الجينومى.

تعرف أبسط أنواع الترانسبوزونات transposones باسم insertion sequences، ورغم توفرها فى كل الكائنات الحية، فإنها درست جيدًا - خاصة - فى البكتيريا. وكل واحدة من الـ insertion sequences تختلف فى ترتيب الدنا فيها (تختلف فى الـ sequence) عن غيرها، إلاّ أنها تشترك جميعها فى صفات تركيبية مشتركة.

وتنتشر الترانسبوزونات فى البكتيريا، والحيوانات، والنباتات.

أما النوع الثالث من الترانسبوزونات فإنها تسمى transposable virons، وهى تصيب العائل القابل للإصابة بحقن ما بها من دنا فيروسى مكتمل التكوين وما يرتبط به من بروتينات داخل الخلية.

إن الترانسبوززنات تتواجد فى كثير من الأنواع النباتية، لكن الجينات القافزة لم تعرف بالتفصيل سوى فى أنواع نباتية قليلة، منها: الذرة، وحنك السبع، والتبغ، والشعير.

ومن بين عائلات العناصر المتحركة التى دُرست تفصيليًا فى الذرة ما يلى:

Activator / Dissociation (Ac/Ds)

Suppressor/Mutator (Enhancer/Inhibitor, En/Spm)

Mutator (Mu)

وتعد العائلة الأولى (Ac/Ds) هى الأكثر تعريفًا ودراسة.

وقد استخدمت تلك الترانسبوزونات فى تعليم عديد من جينات الذرة، وحدث الأمر ذاته بالنسبة للأنواع الأخرى التى درست فيها الترانسبوزونات.

وترجع أهمية الترانسبوزونات بالنسبة للهندسة الوراثية إلى أنها تفيد فى تعليم وتحديد الجينات التى يرغب فى عزلها ونقلها من الكائن الحىّ الذى توجد فيه إلى كائن آخر بطرق الهندسة الوراثية، وكذلك فى تعليمها للجينات الهامة فى أنواع نباتية أخرى لم تُعَرَّف فيها - بعد - جيداً - عناصر متنقلة.

ومن بين الجينات التى أمكن تعليمها تلك المبينة فى جداول (١٢-٨، و ١٢-٩، و ١٢-١٠).

تعرف الرتروترانسبوزونات retrotransposon بأنها دنا متحرك ينتشر فى كل الهيئة الكروموسومية للنبات من خلال وسائط من الرنا، وهى أكثر العناصر المتحركة انتشارًا فى النباتات. وربما يكون لها دور فى نقل المادة الوراثية من موقع لآخر، فيما يعرف باسم transduction (عن Frahm وآخرين ١٩٩٨).

جدول (١٢-٨): عينة من العناصر المتحركة transposable elements التى تعرف فى عدد من المحاصيل الهامة.

النوع النباتى	العنصر المتحرك
Antirrhinum majus	*Tam1*
	Tam2
	Tam3
	Tam7, Tam9
Arabidopsis thaliana	*Ta1*
	Ta1, Ta2, Ta3
	Tag1
	Tat1
Nicotiana alata	*Tna1*
Nicotiana plumbaginifolia	*Tnp1*
Nicotiana tabacum	*Tnt1*
	Tto1
	Npg1
Petunia hybrida	*Act1*
	dTph1
	dTph1-3; dTph4

تابع جدول (١٢-٨).

النوع النباتى	العنصر المتحرك
Zea mays	*Ac/Ds*
	Bg/rbg
	Bs17
	B5
	Cin1
	Cin4
	Cy
	Dt
	En/Spm
	Mu, Mu1
	retro
	rDt
	Stonor
	Uq
	Tourist-Zm1

جدول (١٢-٩): جينات الذرة التى تم تعليمها بالعناصر المتحركة **transposable elements**.

رمز الجين	اسم الجين	العنصر المتحرك
a 1	**Anthocyaninless 1**	*dSpm*
		Dt/rDr
		En
a 2	**Anthocyaninless 2**	*cy/rcy: Mu7*
		dSpm
		En
		Mu 1
adh 1	**alcohol dehydrogrogenase 1**	*BS 1*
		Ds
		Mu
ae 1	**amylose extender 1**	*Mu 1*
an 1	**anther ear 1**	*Mu 2*
b 1	**coloured plant 1**	*Ds*
bt 1	**brittle endosperm 1**	*dSpm*

تابع جدول (١٢-٩).

العنصر المتحرك	اسم الجين	رمز الجين
Mu		
Ac	bronze 1	*bz 1*
Ds		
dSpm		
Mu1		
Ds	bronze 2	*bz 2*
Mu		
Mu1 Mu9		
Ds	coloured aleurone 1	*c 1*
dSpm		
En		
En/Spm	colourless 2	*c 2*
En		
Mu 1		
Mp 1		
Mu	chloroplast protein synthesis 1	*cps 1*
Mu	chloroplast protein synthesis 2	*cps 2*
Mu 8	dwarf plant 3	*d 3*
dSpm	golden plant 2	*g 2*
Mu 1	glossy 1	*gl 1*
Mu 8	glossy 8	*gl 8*
dSpm	glossy 15	*gl 15*
Mu 1	High chlorophyll fluorescence	*hcf 106*
dHbr	helminthosporium carbonum	*hm 1*
Mu 1	susceptibility 1	
Mu 3		
dSpm		
Ds	indeterminate growth 1	*id*
Ds	iojap striping 1	*ij 1*
Mu 1		
Mu 1	Lesion -j2552	*Les -j2552*
Ds	knotted 1	*kn 1*
Mu 1		
Mu 8	ligule-less 2	*lg 2*
Mu	ligule-less 3	*lg 3*
Mu 1	lethal leaf spot 1	*lls 1*

تابع جدول (١٢-٩).

رمز الجين	اسم الجين	العنصر المتحرك
ms 45	male sterile 45	*Ac*
o 2	opaque endosperm 2	*Ac*
		Bg
		Ds
		En/Spm
p 1	pericarp colour 1	*Ac*
pr 1	red aleurone 1	*Ac*
ps 1	pink scutellum 1	*Ac*
Py1-tan	pigmy plant 1	*Mu*
r 1	coloured 1	*Ds*
ren 2	reduced endosperm	*Mu*
ren 3	reduced endosperm 3	*Mu*
rf 2	restorer of fertility 2	*Mu*
		Spm/En
rs 1	rough sheath 1	*Mu 6/7*
sh 1	shrunken 1	*Ds*
		Tourist A
sh 2	shrunken 2	*Ds*
		Ils 1
su 1	sugary 1	*Mu 1*
te 1	terminal ear 1	*Mu 8*
ts	tassel seed 2	*Ac*
vp 1	viviparous	*Mu*
wx 1	waxy 1	*Ac*
		Bg
		Ds
		En/Spm
		dSon
		Mu 8
		magellan
		Retro trans
		Hopscotch
		Tourist A
		Stonor
y 1	white 1	*Mu*

جدول (١٢-١٠): جينات أمكن التعرف عليها بواسطة العناصر المتحركـة transposable element فى نباتات متنوعة (عن Frahm وآخرين ١٩٩٨).

العنصر المتحرك	الجين	النوع النباتى
DS	*dlb 3*	*Arabidopsis thaliana*
Ac	*dif, b-p2-1, eleAc*	
Ds	*drl1*	
Ac	*fae1*	
Ds	*lrp1*	
En	*ms2*	
Ac/Ds	*prl*	
Ds	*ssr16*	
Ds	*tiny*	
Ac/Ds		
Ac	*l6*	*Linum usitatissimum*
Ds	*cf-9*	*Lycopersicon esculentum*
Ac/Ds	*fccbly*	
Ac	*aba2*	*Nicotiana plumbaginifolia*
Ac	*n*	*Nicotiana tabacum*
Ac	*ph6*	*Petunia hybrida*

الفصل الثالث عشر

الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش

تمهيد

إن صفة القدرة على تحمل مبيدات الحشائش يمكن نقلها إلى النباتات بطرق التربية التقليدية، ومن أمثلة ذلك حالة لفت الزيت الذى ربى لتحمل الأترازين. يتعارض هذا المبيد مع عملية انتقال الإليكترونات فى البلاستيدات الخضراء بارتباطه بـ بولى بيبتيدة فى الغشاء البلاستيدتى – هى psbA – وهى التى يُشَفَّرُ لها بواسطة جينوم البلاستيدة الخضراء. ولقد ظهرت طفرات طبيعية مقاومة للأترازين فى عديد من الأنواع النباتية يوجد بها تغيرات ضئيلة جدًّا فى تتابعات الـ psbA. ولقد ربى لفت الزيت المقاوم للأترازين بتهجين لفت الزيت *Brassica napus* مع نوع قريب منه هو الـ birds rape (أو *B. campestris*). وغنى عن البيان أن تلك الطريقة لا تناسب غالبية الأنواع النباتية إما لعدم توفر السلالات المقاومة منها، وإما لعدم توفر المقاومة فى الأنواع القريبة منها التى يمكن أن تلقح معها، ولذا كان الاتجاه نحو الهندسة الوراثية كأداة لتطوير الأصناف المقاومة لمبيدات الحشائش (عن Walden ١٩٨٨)

العوامل التى ساعدت التقدم فى مجال الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش

لقد توفرت أسباب علمية وأخرى تجارية أسهمت فى سرعة تطوير المحاصيل المعدلة وراثيًا التى تتحمل مبيدات الحشائش، كان من أهمها ما يلى:

١ – توفر الكثير من المعلومات التفصيلية عن نظام فعل مبيدات الحشائش، والمسارات الأيضية التى تؤثر فيها

٢ – توفر المصادر البيولوجية التى ساعدت على فهم نظم المقاومة للمبيدات، وكذلك جينات المقاومة، والتى من أمثلتها

أ – البكتيريا المقاومة، سواء أكانت طبيعية، أم حُصل عليها بالانتخاب المختبرى
ب – النباتات المتحملة التى حُصل عليها من مزارع الأنسجة.
جـ – النباتات المتحملة التى انتخبت تحت ظروف الحقل.

٣ – بساطة وراثة مختلف حالات التحمل، حيث تبين أن جينًا واحدًا يتحكم فى كل حالة منها

٤ – توفر لدى شركات إنتاج مبيدات الحشائش الحافز المادى القوى لإنتاج الأصناف المقاومة لتلك المبيدات.

ويتركز الاهتمام بهندسة النباتات وراثيًا لتحمل مبيدات الحشائش على المبيدات التى تستخدم بمعدلات منخفضة، والتى تتحلل بيولوجيًا بصورة سريعة، والتى لا تصل إلى المياه الجوفية، وبذا يقل تلوث البيئة بالمبيدات التى لا توجد بها تلك الصفات ومن بين أهم المبيدات التى تنطبق عليها هذه الصفات: الجلايفوسيت glyphosate (مثل الروند أب)، والسلفونيل يوريا sulfonylurea، والجلوفوسينيت glufosinate وقد تنطبق تلك المواصفات – كذلك – على البروموكسينيل bromoxynil، فهو يتحلل بيولوجيًا بسرعة، ولكننا لا نعرف ماذا يحدث لنواتج التحلل، وما هى تأثيراتها على النباتات وعلى الكائنات الدقيقة فى التربة (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

طرق واستراتيجيات الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش

يتعين بداية تحديد الأساس الجزيئى لعمل مبيدات الحشائش لأجل إنتاج نباتات مهندسة وراثيًا لتحمل تلك المبيدات، الأمر الذى دُرِسَ جيدا من قِبل شركات إنتاج المبيدات هذا وترجع فاعلية معظم المبيدات الناجحة إلى تأثيرها على خطوة واحدة فى المسار الكيميائى الحيوى، حيث تؤثر على تفاعل إنزيمى يلعب دورًا حيويًا فى أيض الخلية. وعلى سبيل المثال . فإن موقع فعل المبيدين chlorsulfuron (كما فى المبيد التجارى Glean)، و sulfometuron methyl (كما فى المبيد التجارى Oust) هو الإنزيم acetolactate synthase، وهو أول إنزيم متخصص فى مسار تمثيل الأحماض الأمينية المتفرعة الأيزوليوسين isoleucine، والليوسين leucine، والفالين valine (عن Walden ١٩٨٨).

ويتبع في برامج هندسة النباتات لمقاومة مبيدات الحشائش إحدى استراتيجيتين، كما يلي:

أولا: إفقاد مبيد الحشائش لسميته Detoxification

يمكن إفقاد مبيدات الحشائش لفاعليتها - وبالتالى إفقادها لسميتها - بنقل جينات للنباتات تتحكم فى إنتاج إنزيمات تعمل على مبيد الحشائش وتغير من خصائصه. حيث يقوم الإنزيم الذى ينتجه الجين المنقول بتحليل مبيد الحشائش الذى يصل إلى النبات ومن أمثلة ذلك الجين bar المتحصل عليه من البكتيريا *Streptomyces hygroscopicus* والذى يكسب النباتات التى ينقل إليها معاومة ضد مبيدات الحشائش التى يدخل فى تركيبها الـ phosphinothricin (اختصارا ppt) ينتج هذا الجين الإنزيم phosphinothricin acetyl transferase (اختصارا PAT) الذى يحلل الـ ppt إلى طراز يحتوى على الـ acetyl (طراز acetylate) يكون غير سام وقد تبين أن النباتات التى نقل إليها هذا الجين أمكنها النمو فى تركيزات من الـ ppt بلغت ٤ - ١٠ أضعاف التركيزات المستعملة منه - عادة - فى مكافحة الحشائش

كذلك فإن الجين bxn من البكتيريا *Klebsiella ozaenae* - والذى يتحكم فى إنتاج إنزيم الـ nitrilase - يكسب النباتات مقاومة ضد مبيدات الحشائش التى تحتوى على المادة الفعالة bromoxynil. ولقد أنتج بالفعل فى الولايات المتحدة صنفا من القطن (الصنف BXN) مقاوم للـ bromoxynil

ومن بين الجينات الأخرى التى استعملت فى مقاومة مبيدات الحشائش الجين tfdA لتحمل الـ 2,4-D، والجين GST لتحمل الأترازين Atrazine (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

ثانيًا: إدخال جينات لا تعمل عليها مبيدات الحشائش

يمكن جعل النباتات مقاومة لمبيدات الحشائش بإكسابها جينات تتحكم فى إنتاج إنزيمات لا تكون حساسة للمبيدات تعمل هذه الجينات الطفرية على إنتاج إنزيمات لا يمكن لمبيدات الحشائش التعرف عليها، ومن ثم فإن النباتات لا تُقتل بفعل المبيد ومن أمثلة ذلك الجين الطفرى aroA من البكتيريا *Salmonella typhimurium* الذى استعمل

في إنتاج نباتات متحملة للمبيد جلايفوسيت glyphosate يعمل مبيد الجلايفوسيت على إنزيم البلاستيدات الخضراء 5-enol pyruvylshkikimic acid 3-phosphate synthase (اختصارا EPSPS) ويؤدى نقل الجين الطفرى aroA إلى إنتاج إنزيم EPSPS محور لا يميزه الجلايفوسيت، ومن ثم لا يؤثر فيه ولقد أنتجت بالفعل أصنافا مقاومة للجلايفوسيت، مثل صنف فول الصويا Roundup Ready، وكذلك صنف القطن Roundup Ready

كذلك فإن مبيدى الحشائش sulphonylurea، و imidazolinone يثبطان إنزيم acetolactate synthase (اختصارا ALS) الخاص بالبلاستيدات الخضراء وقد أمكن هندسة نباتات مقاومة لهذين المبيدين بنقل الجين ذات الأصل النباتى ALS (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

وتتحقق عمليات التحول الوراثى لتحمل مبيدات الحشائش فى النباتات بعدة طرق، نوجزها فيما يلى:

١ - التعبير الكثيف للبروتين الذى يعمل عليه المبيد، كما هو الحال بالنسبة للإنزيمات التى تتأثر بالجلايفوسيت glyphosate

٢ - إحداث طفرة بالبروتين الذى يعمل عليه المبيد لكى لا يتعرف عليه المبيد، ومن أمثلة ذلك طفرة التبغ التى تحتوى على جين acetoacetate synthase، والتى استعملت فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الـ sulfonylurea

ومنها كذلك حالات التحول الوراثى لتحمل كلا من المبيدات التالية

asulam	glyphosate
chlorosulfuron	atrazine

٣ - تحويل النباتات وراثيًا بجين يُلغى الأثر السام للمبيد، وتحويله إلى صورة غير سامة، وهو الذى يُتحصل عليه من البكتيريا، مثل حالات المقاومة لكل من

bromoxynil	bilanafos
	phenoxyacetic acid

ويمكن التوصل إلى تلك الإنزيمات – بسهولة – بتقييم الأنواع والسلالات النباتية المقاومة للمبيد، وكذلك غربلة الكائنات الدقيقة التى تعيش فى التربة المحتوية على المبيد والتى يمكنها تحليل مادته الفعالة ومن المهم طبعًا ألا تكون نواتج عمل الإنزيم على المبيد سامة للإنسان أو الحيوانات.

٤ – إنتاج جينات معمليًا يمكن أن تشفر لتكوين بولببتيدات مقاومة، الأمر الذى يمكن تحقيقه إذا ما عرف تركيب البولببتيدات المستهدفة وكيفية فعل المبيد (عن Walden ١٩٨٨، و Mullineaux ١٩٩٢).

التحول الوراثى لتحمل أنواع مختلفة من مبيدات الحشائش

الجلايفوسيت

إن الجلايفوسيت glyphosate – وهو المادة الفعالة لمبيدات مثل الروندأب Roundup، وتمبل ويد Tumbleweed يعد من المبيدات الواسعة المفعول غير المتخصصة والفعالة ضد عديد من النباتات. يُمتص المبيد سريعًا بواسطة النبات، وينتقل سريعًا – كذلك – عن طريق اللحاء، ولذا .. تزداد فاعليته ضد الحشائش المعمرة. وهو يُعد مقبولاً بيئيًّا، نظرًا لعدم سميته للحيوانات وسرعة تحلله بواسطة كائنات التربة.

يستهدف المبيد الإنزيم 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (اختصارًا: EPSP synthase)، الذى يعمل فى البلاستيدات الخضراء، ويُشفَّر له بواسطة جين يقع فى النواة، والذى يعد من الإنزيمات الرئيسية للـ shikimate pathway الذى يتضمن تمثيل الأحماض الأمينية الأروماتية: التربتوفان، والفينيل آلانين، والتيروزين؛ علمًا بأن هذا المسار البيولوجى لا يوجد سوى فى النباتات والكائنات الدقيقة؛ بما يعنى عدم سمية المبيد للإنسان؛ الأمر الذى يجعل من تطوير محاصيل زراعية مقاومة له أمرًا هامًا (عن Walden ١٩٨٨).

ولقد اتبعت استراتيجيتان لتطوير نباتات محولة وراثيًا مقاومة للجلايفوسيت، كما يلى:

١– فى بداية الأمر تضمنت عملية هندسة نباتات مقاومة للمبيد استخدام جين – وجد فى سلالة من *Petunia hybrida* – كان قادرا على إحداث زيادة فى إنتاج الإنزيم

المستهدف EPSP synthase وبالإضافة إلى الفائدة المباشرة لاستعمال هـذا الجـين، فإنـه سهل عملية تمثيل وعزل دنا ممثل للـ EPSP synthase مكّن البـاحثين مـن زيـادة قـدرة البيتونيا كثيرًا على تحمل الجلايفوسيت (حتى ٩٠ جم/هكتار)

٢ – نظرًا لأن الجلايفوسيت لا يثبط الـ EPSP synthases بالكائنات الدقيقة، فقد أمكن بالانتخاب للنمو البكتيرى – فى وجود تركيزات عالية من الجلايفوسيت تكفى لوقف نمو البكتيريا العاديـة – أمكـن عـزل طفـرات بكتيريـة متحملـة للجلايفوسـيت مـن كـل مـن *Salmonella typhimurium*، و *Aerobacter aerogenes*، *Escherichia coli*. ولقـد أمكن بهذه الاستراتيجية تعديل التبغ، والطماطم، والبيتونيا وراثيًا بجـين مـن البكتيريـا *Salmonella typhimurium* (الجين aroA)، وهو جين يشفر لطـراز مـن الإنـزيم EPSPs لا يأتلف (ينجذب) كثيرًا للجلايفوسيت، مما جعل النباتات أكثر تحملا للمبيـد، ولكـن دون القـــدرة علـــى مقاومتـــه (عـــن Walden ١٩٨٨، و Gardner وآخـــرين ١٩٩١، و Hopkins ١٩٩٥).

الترايازين

إن مبيدات الحشائش المحتوية على الترايـازين triazine (مثـل الأتـرازين atrazine، والسيمازين simazine) توقف انتقال الإليكترونات بارتباطها بـالبروتين 32-kDa D1 فـى الـ photosystem II (اختصارًا PSII).

ويعرف نظامان لمقاومة مبيدات الترايازين، هما:

١ – يدخل الترايازين النباتات – غالبًا – عن طريق الجذور، وهى التى تحتـوى فـى بعـض الأنـواع المحصـولية – مثـل الـذرة والسـورجم – علـى الإنـزيم glutathione-S-transferase، الذى يوقف سمية المبيد سـريعًا بربطـه بالجلوتـاثيون glutathione ولهـذا السبب فإن مبيدات الترايازين تعد مبيدات اختيارية هامة لهـذين المحصـولين. ولقـد عزل هذا الجين من الذرة، وأصبح متاحًا لعمليات التحول الـوراثى فـى الأنـواع النباتيـة الحساسة للأترازين

٢ – طورت عديد من الحشائش مثل الـ *Amaranthus*، و *Chenopodium* سـلالات

مقاومة للترايازين. ويمكن فى كل حالات المقاومة تتبع جذورها إلى حدوث طفرة فى الجين psbA الذى يشفر للبروتين D1 فى الـ PSII. ومرد هذه الطفرة إلى تغير فى حامض أمينى واحد فى البروتين D1 من السيرين serine إلى جليسين glycine، الأمر الذى يخفض الألفة (الانجذاب) بين البروتين والترايازينات ألف مرة.

وعلى الرغم من أن الحشائش المقاومة للترايازين سوف تبقى مشكلة يتعين التعامل معها، فإن نقل جين المقاومة هذا من الحشائش إلى المحاصيل الزراعية يمكن أن يكون ذا فائدة كبيرة. ولسوء الحظ .. فإن التشفير للبروتين D1 يحث من خلال جينوم البلاستيدات الخضراء، حيث أحبطت محاولات الهندسة الوراثية لإنتاج نباتات مقاومة للترايازين بالصعوبات التى تواجه تحويل دنا الكلوروبلاستيدات. وفى إحدى الحالات .. استخدمت الطرق الكلاسيكية لتربية النبات فى نقل هذا الجين، وذلك بالتلقيح بين النوع المقاوم *Brassica campestris* ولفت الزيت *B. napus*. وعلى الرغم من أن نباتات لفت الزيت التى حُصِلَ عليها من برنامج التربية كانت مقاومة للترايازين، إلاَّ أن محصولها كان يقل بمقدار ٢٠٪ عن محصول النباتات غير المقاومة (عن Hopkins ١٩٩٥).

المبيدات المؤثرة فى الإنزيم أسيتوهيدروكسى آسد سنثيز

توجد مجموعة غير متجانسة من مبيدات الحشائش (هى: الـ sulfonylureas، و imidazoline، والـ triazolopyrimidine) لا يجمعها سوى اشتراكها فى التأثير على الإنزيم acetohydroxyacid synthase (اختصارًا: ALS). يتواجد هذا الإنزيم فى كل من النباتات والكائنات الدقيقة، وهو يؤثر فى مرحلة مبكرة من تمثيل الأحماض الأمينية ذوات السلسلة المتفرعة: الإيزوليوسين isoleucine، والليوسين leucine، والفالين valine.

وقد وجد أن سلالة التبغ Hra تحتوى على طفرة فى الجين المسئول عن تمثيل الإنزيم ALS تجعل النباتات مقاومة للـ sulfonylureas بأكثر من ١٠٠٠ ضعف مقاومة النباتات العادية. ولقد استخدم هذا الجين فى تطوير نباتات مقاومة لهذا المبيد من كل من الطماطم، وبنجر السكر، والقطن، والبرسيم الحجازى، والتبغ (عن Hopkins ١٩٩٥).

التطبيقات العملية لعمليات التحول الوراثى لتحمل مبيدات الحشائش

يعطى جدول (١٣-١) قائمة بالجينات المسئولة عن المقاومة لمبيدات الحشائش، ومصادرها، وطبيعة المقاومة، والمحاصيل التى نقلت إليها تلك الجينات بطرق الهندسة الوراثية

جدول (١٣-١): الجينات المسئولة عن المقاومة لمبيدات الحشائش واستعمالاتها (عن Gressel ١٩٩٨)

الجين	المبيد المقاوَم	مصدر الجين	طبيعة المقاومة	المحاصيل المقاومة
AroA	Glyphosate	طفرة نباتية	موقع محدد للتأثير	فول الصويا – الذرة – القطن – لفت الزيت
bar, pat	Glufosinate	بكتيريا	أيضى	الطماطم – بنجر السكر – القمح – لفت الزيت – الأرز – البطاطس – الفول السودانى – البرسيم الحجازى – الذرة
csr1, ahas3r	Imidazolinone, Sulfonylurea, Triazopyrimidine	طفرة نباتية	موقع محدد للتأثير	الذرة – التبغ – الكتان – لفت الزيت
sulI	Asulam	بكتيريا	موقع محدد للتأثير	التبغ
	مثبطات الـ ACCase	طفرة مزارع أنسجة	موقع محدد للتأثير	الذرة
tfdA	2,4-D	بكتيريا	أيضى	القطن – التبغ
bxn	Bromoxynil	بكتيريا	أيضى	القطن
deh1	Dalapon	بكتيريا	أيضى	التبغ
	Isoxaben	نبات	غير معلوم	لا يوجد بعد
	Dichlobenil	نبات	غير معلوم	لا يوجد بعد
crt1	Pyridazinones	بكتيريا	موقع محدد للتأثير	التبغ
pcd	Phenmedipham	بكتيريا	أيضى	التبغ
psbA	Atrazine	نباتات	موقع محدد للتأثير	البطاطس – لفت الزيت – التبغ

كما يبين جدول (١٣-٢) مزيدًا من التفاصيل عن عمليات التحول الوراثي التي أجريت بمعرفة مختلف شركات التكنولوجيا الحيوية في مختلف المحاصيل الزراعية لأجل إنتاج أصناف جديدة قادرة على تحمل نوعيات مختلفة من مبيدات الحشائش.

هذا .. ومن أوائل الأصناف التجارية التي أنتجت بهدف تحمل مبيدات الحشائش أصنافًا من المحاصيل الحقلية التالية:

المحصول	مصدر جين التحمل	المبيد الذي يتحمله الصنف المنتج	الشركة المنتجة للصنف
القطن	بكتيريا	Bromoxynil	Calgene
	بكتيريا/ *Arabidopsis*	Glyphosate	Monsanto
فول الصويا	بكتيريا/البيتونيا/فول الصويا	Glyphosate	Monsanto
	بكتيريا	Glufosinate	Hoecht/Agr Evo
لفت الزيت	بكتيريا	Glufosinate	Hoecht/Agr Evo
الذرة	بكتيريا	Glufosinate	Dekalb
	بكتيريا	Glufosinate	Hoecht/Agr Evo
	التبغ/بكتيريا	Sulfonyl urea	Dupont
		Glyphosate	Monsanto

الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش في الطحالب المثبتة لآزوت الهواء الجوى

يحتاج النمو الجيد للأرز إلى الـ cyanobacteria (وهي من الطحالب الخضراء المزرقة) التي تقوم بتثبيت الهواء الجوى، وتعيش إما حرة، وإما بالتعاون مع السرخس: *Azolla*، ذلك لأن الأرز يُنتج في عديد من دول العالم النامي إما بدون تسميد آزوتي، وإما بالقليل جدًا منه. ولقد أدى استعمال مبيدات الحشائش - وخاصة تلك التي توقف عملية البناء الضوئي - إلى التأثير على الطحلب كذلك، الذي يتأثر أيضًا ببعض مبيدات الحشائش الأخرى التي لا تؤثر في عملية البناء الضوئي، مثل ألاكلور alachlor، ولذا .. فقد تولدت الحاجة إلى إنتاج سلالات من تلك الطحالب مقاومة لمبيدات الحشائش التي يمكن أن تستخدم في حقول الأرز.

جدول (١٣-٢) أمثلة لحالات التحول الوراثي التي أجريت بمعرفة مختلف شركات التكنولوجيا الحيوية في مختلف المحاصيل الزراعية لأجل إنتاج أصناف جديدة قادرة على تحمل نوعيات مختلفة من مبيدات الحشائش (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

فئة المبيد	المبيد أو المركب التجاري	الجين المنقول والآلية	الشركة	المحاصيل
Glycine	Glyphosate (Roundup)	*Agrobacterium* CP4- resistant gene	Monsanto	فول الصويا، ولفت الزيت والطماطم
	Glyphosate (Roundup)	Maize resistant gene	Monsanto	الذرة
	Glyphosate (Roundup)	Oxidoreductase detoxification	Monsanto	الذرة، ولفت الزيت، وفول الصويا
Phosphinic acid	Phosphinothricin (Basta), (Liberty)	*bar* gene- phosphinothricin acetyltransferase detoxification	Hoechst/AgrEvo/Aventis Novartis/Syngenta	الذرة، والأرز، والقمح، والقطن، ولفت الزيت، والبطاطس، والطماطم، وبنجر السكر
Sulphonylurea	Chlorsulphuron (Glean)	Mutant plant acetolactate synthase	DuPont- Pioneer Hi-Bred	لفت الزيت، والكتان، والأرز، والطماطم وبنجر السكر، والذرة
Imidazolinone	(Arsenal)	Mutant plant acetolactate synthase	American Cyanamid	
S-triazines	Atrazine (Lasso)	Mutant plant chloroplast *psbA* gene	DuPont, Ciba-Geigy/Novartis	فول الصويا
Nitriles	Bromoxynil (Buctril)	Nitrilase detoxification	Calgene	القطن، ولفت الزيت، والبطاطس، والطماطم
Phenoxy-carboxylic acids	2,4-D	Monooxygenase detoxification	Schering/AgrEvo	الذرة والقطن

ولقد وجدت بالفعل طفرات من الطحالب الخضراء المزرقة مقاومة لمبيدات الحشائش: butachlor، و fluchloralin، و alachlor، و atrazine، و propanil. وجــدت تلــك الطفرات في *Gleocapsa* sp.، ونقلت بطرق الهندسـة الوراثيـة إلى النـوع المثبـت لآزوت الهواء الجوى *Nostac muscorum* (عن Gressel ١٩٩٣).



الفصل الرابع عشر

الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

يُتحصل على الجينات التى تستعمل فى تحويل النباتات وراثيًا لجعلها مقاومة للفيروسات من مصادر متنوعة، فهى قد تكون من الفيرس ذاته، أو من العائل النباتى الذى يرغب فى حمايته أو الأنواع القريبة منه، أو من مصادر نباتية راقية أخرى، أو من الكائنات الدقيقة، أو حتى من الثدييات بما فى ذلك الإنسان.

التحول الوراثى بجينات فيروسية

أمكن هندسة نباتات مقاومة للفيروسات بالاستفادة من جينات متحصل عليها من الفيروسات ذاتها، فيما يعرف باسم pathogen-derived resistance.

إن الفكرة من وراء ما يعرف بالمقاومة المستمدة من المسبب المرضى كما فى بعض حالات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات – هى أن التعبير عن بعض جينات المسبب المرضى (الفيرس فى حالتنا تلك) فى العائل سوف يخل بالتوازن الطبيعى لمكونات الفيرس، وبالتالى يتعارض مع دورة حياة الفيرس. وفى أكثر الحالات نجاحًا يؤدى ذلك الخلل إلى منع تكاثر الفيرس أو تحركه إلى أبعد من الخلية التى حدثت فيها الإصابة. وحتى فى الحالات التى يقل فيها التعارض مع دورة الحياة، فإن المقاومة المستمدة من المسبب المرضى ربما تحد من الأعراض المرضية، وتتسبب فى حدوث إصابات موضعية فقط.

وعلى الرغم من اختلاف الفيروسات فى طرق انقسامها، إلا أن جميع الفيروسات النباتية تشترك فى خطوات عامة فى دورات حياتها؛ فهى يجب أن تدخل خلايا العائل النباتى بإحدى طرق الانتقال الفيروسة المعروفة والتى تختلف من فيرس لآخر، يلى ذلك حدوث انفتاح فى جزئ الفيرس أو تفكك جزئى لمحتوياته، مما يعرض دنا

أو رنا الفيرس للوسط الخلوى المحيط به. وإذا ما كان الفيرس يحمل رنا كمادة وراثية فإنه يبدأ على الفور فى إنتاج البروتينات الخاصة بالفيرس (بروتينات الغلاف البروتينى) لأجل تكاثره. أما إذا كان الفيرس حاملاً لدنا كمادة وراثية فإنه يدخل نواة العائل أولاً ويوجه إنزيمات العائل لإنتاج الرنا الرسول المناسب لأجل نقل الشفرة الوراثية

ومن أهم الخطوات فى تكاثر فيروسات الرنا إنتاج بروتين أو بروتينات إنزيم الـ replicase بالاعتماد على خلايا العائل ذاتها، الأمر الذى يؤدى إلى تكاثر الفيرس.

ويعتقد بأن معظم فيروسات الرنا تنتشر من خلية إلى أخرى عبر الروابط البروتوبلازمية plasmodesmata كحامض نووى (رنا) بحماية ومساعدة بروتين خاص بذلك، أو فى حالات الحركة لمسافة طويلة من خلال الاقتران بغلاف بروتينى نشط. وبذا .. فإن كل مرحلة من دورة الإصابة الفيروسية يمكن التأثير سلبيًّا عليها، وتلك المراحل هى مرحلة التخلص من الغلاف البروتينى uncoating، وترجمة الشفرة الوراثية translation، والانقسام replication، والحركة ويكون الهدف من هندسة نباتات مقاومة للفيروسات هو التعبير فيها عن جزء من الجينوم الفيروسى سواء أتضمن هذا التعبير الغلاف البروتينى، أم لم يتضمن، بما يتعارض مع أحد جوانب دورة التكاثر. وتتضمن استراتيجيات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات النباتية عدة اتجاهات كما سيأتى بيانه (عن Scholthof ١٩٩٣)

الشفرة الوراثية الكاملة لسلالة ضعيفة من الفيرس

فى بداية محاولات إنتاج نباتات محولة وراثيًا مقاومة للفيروسات اتجه الباحثون نحو نقل الحامض النووى الكامل complete genome الخاص بسلالة ضعيفة من الفيرس إلى النبات، حيث يمكن أن يكسب ذلك النبات وقاية ضد السلالات الأخرى الأكثر ضراوة من نفس الفيرس وقد طبقت هذه الطريقة بالنسبة لفيرس موزايك التبغ فى التبغ، ونمت النباتات التى نقل إليها الحامض النووى للفيرس بصورة طبيعية، وكانت خالية من أعراض الفيرس، أو أظهرت موزايكا خفيفا بالأوراق. ولم تتأثر هذه النباتات عندما تعرضت للعدوى بسلالة عالية الضراوة من نفس الفيرس

ومن عيوب هذا التطبيق للهندسة الوراثية ما يلى:

١ – ضرورة العثور على سلالة ضعيفة من الفيرس.

٢ – أن السلالة الضعيفة قد تؤثر على كمية، أو نوعية المحصول.

٣ – قد تحدث طفرة بالسلالة الضعيفة تجعلها أكثر ضراوة.

٤ – قد يحدث تفاعل بين هذه السلالة الضعيفة وفيروسات أخرى يترتب عليها حدوث أعراض مرضية شديدة، مثل التفاعل الذى يحدث بين فيرس موزايك التبغ وفيرس x البطاطس فى الطماطم الذى يؤدى إلى ظهور أعراض التخطيط المزدوج (عن Grumet ١٩٩٠).

جين الغلاف البروتينى للفيرس

يطلق على المقاومة التى تتحقق عن طريق الغلاف البروتينى الفيروسى اسم viral coat protein mediated resistance (اختصارًا: CP-MR). ولقد عرف منذ عام ١٩٨٦ أن نقل الجين المسئول عن تمثيل الغلاف البروتينى لفيرس موزايك التبغ إلى نبات التبغ قلل جوهريًّا تكاثر الفيرس بالنبات. وقد أعقب ذلك تطبيق هذه الطريقة بنجاح كبير فى عدد كبير جدًّا من الفيروسات والعوائل، وهى تعد أكثر الطرق شيوعًا فى مقاومة الأمراض الفيروسية، على الرغم من بعض الأمور التى تؤخذ عليها؛ فالحماية ضد الفيرس نادرًا ما تكون كاملة، كما توجد أمثلة لحالات كثيرة لم تُجد فيها تلك الطريقة فى الحماية من الفيرس.

هذا .. ويبدو أن التعبير الزائد للغلاف البروتينى للفيرس فى النبات العائل يتعارض مع خاصية تخلص الفيرس من غلافه، وكذلك يتعارض مع تكاثره وحركته، وربما مع مراحل أخرى من دورة حياته (عن Bent & Yu ١٩٩٩).

وتعتمد هذه الطريقة فى مكافحة الفيروسات على مبدأ الوقاية المكتسبة بطريق الهندسة الوراثية، ولذا .. فإنه يطلق عليها – عادة – اسم genetically engineered cross protection، وهى تتشابه – من حيث المبدأ – مع الوقاية التى توفرها الإصابة بسلالة ضعيفة من الفيرس ضد الإصابة بسلالة أخرى منه عالية الضراوة، بسبب تواجد

الغلاف البروتيني للسلالة الأولى قبل وصول السلالة الثانية والفرق بين الوقاية المكتسبة في الحالتين أن الغلاف البروتيني الفيروسي الذي يُصنِّعه النبات – في الحالة الأولى – يكون خاليًا من الحامض النووي الفيروسي، بينما يتواجد الفيرس كاملاً في حالة العدوى بسلالة ضعيفة للوقاية من سلالة أكثر ضراوة. وغني عن البيان أن الوقاية المكتسبة بطريق الهندسة الوراثية تحقق جميع مزايا الوقاية المكتسبة الكلاسيكية دون أي من عيوبها

هذا ولا يوفر الغلاف البروتيني الذي يُصنِّعه النبات وقاية ضد سلالة الفيرس التي أخذ منها الجين فقط، وإنما ضد جميع السلالات الأخرى لنفس الفيرس. وضد الفيروسات الأخرى التي تشترك مع الفيرس المعني في خصائصها السيرولوجية (عن Grumet ١٩٩٠).

وتتميز جميع حالات التحول الوراثي لمقاومة الفيروسات – باستعمال جين الغلاف البروتيني للفيروسات – بما يلي:

١ – تكون المواقع التي تحدث عندها الإصابة في الأوراق المحقونة بالفيرس أقل عددًا من نظيراتها في النباتات غير المحولة وراثيًّا

٢ – يكون معدل انتشار الإصابة الجهازية أقل سرعة مما في النباتات العادية

٣ – يقل تراكم الفيرس في النباتات المحولة وراثيًا عما يحدث في النباتات غير المحولة

ويمكن – عادة – التغلب على مظاهر المقاومة تلك بزيادة التركيز المستخدم في حقن الفيرس (عن Beachy وآخرين ١٩٩٠)

ولقد نجحت هذه التقنية في كل من النباتات ثنائية الفلقة وأحادية الفلقة على حد سواء

وعلى الرغم من أن الحماية التي توفرها تقنية التحول الوراثي بالجين المسئول عن تكوين الغلاف البروتيني للفيرس تقتصر فقط على الفيرس المعني والسلالات القريبة الشبه

منه، إلا إنه تعرف بعض الحالات التى تمتد فيها الحماية إلى عدد من الفيروسات الأخرى المتباينة.

نجد فى معظم الحالات أن الغلاف البروتينى يعمل فقط ضد الفيرس الكامل، بينما لا يتأثر اللقاح الذى يتكون من الرنا الفيروسى المجرد من الغلاف البروتينى (عندما يجرى التلقيح تجريبيًّا) .. لا يتأثر بجين الغلاف البروتينى فى النبات؛ حيث يمكن للرنا الفيروسى إحداث الإصابة. هذا .. إلاَّ أنه توجد حالات شاذة لتلك القاعدة.

ولأسباب ليست معروفة بعد .. نجد أن الحماية التى يوفرها التحول الوراثى بجين الغلاف البروتينى لا ترتبط بالضرورة بأى تعبير عن الغلاف البروتينى؛ ففى بعض الحالات كانت الحماية أعلى عند مستويات منخفضة من تراكم الغلاف البروتينى فى النبات.

وأحيانًا .. تتوفر الحماية نتيجة لتراكم الرنا الرسول mRNA الخاص بالغلاف البروتينى، دونما ارتباط بتراكم الغلاف البروتينى ذاته (عن Scholthof وآخرين ١٩٩٣).

هذا .. وعند تلقيح (حقن) أوراق النباتات المحولة وراثيًّا بجين الغلاف البروتينى لفيرس ما .. عند حقنها بجزيئات الفيرس ذاته، فإنها تُظهر عددًا قليلاً من البقع الصفراء المخضرة أو المتحللة مقارنة بما يحدث فى النباتات العادية، كما تقل فيها الإصابة الجهازية، أو تتأخر، أو تنعدم. وفى جميع الحالات التى أجرى فيها التحول الوراثى بتلك الكيفية (كما فى كل من الفيروسات. موزايك التبغ، وموزايك البرسيم الحجازى، وإكس البطاطس، وموزايك الخيار، وتخطيط التبغ .. وهى ذات أشكال مختلفة، وتنتمى إلى مجموعات فيروسية مختلفة، وتنتقل - طبيعيًّا - بوسائل مختلفة) . فى جميع هذه الحالات لم تظهر على النباتات المحولة وراثيًّا أية تأثيرات سلبية على النمو، أو الخصوبة، أو الشكل المظهرى للنبات، كما كانت المقاومة فيها ثابتة وراثيًّا وانتقلت للنسل لأجيال عديدة.

يتراوح تركيز الغلاف البروتينى للفيرس - عادة - بين ٠,٠١٪، و ٠,٢٪ من المحتوى البروتينى الذائب الكلى بالنباتات المحولة وراثيًّا، ويتوقف التركيز الفعلى

على الفيرس، والـ promoter المستعمل، وعدد نسخ جين الغلاف البروتيني التى نقلت فعلا إلى النبات المحول وراثيًا، وموضع إيلاج جين الغلاف البروتينى فى الهيئة الكروموسومية للنبات العائل.

ويتوقف مستوى المقاومة فى النباتات المحولة وراثيًا على تركيز الغلاف البروتينى فى النبات، وليس على الرنا الرسول للغلاف البروتينى (عن Grumet ١٩٩٠).

وفى بعض الحالات نجد أن مستوى الحماية يتناسب طرديًا مع مستوى التعبير عن الغلاف البروتينى فى النباتات، وذلك كما فى حالات فيرس موزايك البرسيم الحجازى AlMV، وفيرس إكس البطاطس PVX، وفيرس تخطيط الأرز RSV، وفيرس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم TYLCV. كذلك فإن خفض مستوى الغلاف البروتينى لفيرس موزايك التبغ TMV بالمعاملة الحرارية قلل من مستوى الحماية ضد الفيرس

هذا إلاّ أنه فى حالات أخرى لا يوجد بالضرورة ارتباط بين مستوى الغلاف البروتينى ومستوى المقاومة، وذلك كما فى بعض الـ potyviruses، و luteoviruses، والـ tospoviruses كما وجد أن الحماية ضد فيرس موزايك الزوكينى الأصفر ZYMV فى القاوون (والتى لا تظهر فيها على النباتات أية أعراض مرضية لمدة ٩٠ يوما بعد حقنها بالفيرس) لا ترتبط بمستوى التعبير عن الغلاف البروتينى فى النباتات المحولة وراثيًا

وفى حالات كثيرة .. أمكن كسر المقاومة التى يوفرها جين الغلاف البروتينى بزيادة تركيز اللقاح المستعمل فى حقن الفيرس، وذلك كما فى حالات فيرس موزايك التبغ.، وفيرس موزايك البرسيم الحجازى، وفيرس ذبول الطماطم المتبقع TSWV، وفيرس موزايك فول الصويا SMV، وفيرس موزايك البطيخ WMV، وفيرس موزايك الزوكينى الأصفر، هذا إلا أنه ظهرت مستويات مختلفة من المقاومة عند التلقيح بتركيز واحد من فيروسات مختلفة لنباتات محولة وراثيًا بجين الغلاف البروتينى لتلك الفيروسات ومن الطبيعى أن المستويات العالية من المقاومة التى يمكن أن يوفرها جين الغلاف البروتينى تكون مطلوبة، ولكن الأهم هو أن تكون تلك المستويات مناسبة لمستويات اللقاح الفيروسى التى تحدث طبيعيًا فى الظروف الحقلية

وتجدر الإشارة إلى أنه في حالات الفيروسات التي يمكن أن تنتقل إلى النباتات بأكثر من طريقة (مثل النقل بالمنّ والنقل الميكانيكي)، فإن المقاومة التي يوفرها جين الغلاف البروتيني تظهر عندما ينتقل الفيرس إلى النباتات بأي من الطريقتين، وذلك كما في حالة فيرس موزايك الخيار CMV، وفيرس إكس البطاطس PVX، وفيرس واي البطاطس PVY، لكن ذلك لم يتحقق في حالة فيرس خشخشة التبغ TRV – الذي ينتقل ميكانيكيًا وبالنيماتودا – حيث أظهرت النباتات المحولة وراثيًا مقاومة ضد الحقن الميكانيكي فقط (عن Grumet ١٩٩٥).

تتوفر عدة أدلة تفيد بأن آلية المقاومة التي تتحقق بفعل جين الغلاف البروتيني تعتمد على المجموعة الفيروسية التي ينتمي إليها الفيرس ففي حالة فيروسات موزايك التبغ TMV، وموزايك البرسيم الحجازي AlMV، وإكس البطاطس PVX ترتبط قوة المقاومة إيجابيًا بمستوى التعبير عن الغلاف البروتيني في النباتات المحولة وراثيًا، وعلى الجين نفسه، وفي حالتي الـ TMV والـ AlMV – على سبيل المثال – لم تكن النباتات التي يتراكم فيها شريط الدنا (الـ transcript) الخاص بجين الغلاف البروتيني (coat protein transcript) – فقط – دون أي تراكم للغلاف البروتيني ذاته – لم تكن مقاومة. هذا إلاّ إنه في حالات أخرى (فيرس واي البطاطس PVY، وفيرس التفاف أوراق البطاطس PLRV على سبيل المثال) ارتبطت المقاومة بمستوى تراكم شريط الدنا (الـ transcript) الخاص بجين الغلاف البروتيني، وليس بمستوى تراكم الغلاف البروتيني ذاته. ومما يزيد الصورة تعقيدا أنه في حالة ذبول الطماطم المتبقع (TSWV) حُصل على المقاومة في حالتي التحويل الوراثي بأي من جين الغلاف البروتيني كاملاً، أو بعد جعله غير صالح للاستنساخ، من خلال إزالة الـ ATG codon البادئ لعملية الاستنساخ (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

ولقد أظهرت الدراسات بعض المفارقات فيما يتعلق بمدى المقاومة التي يوفرها جين الغلاف البروتيني لفيرس ما ضد الفيروسات الأخرى. وعلى سبيل المثال .. وجد أن جين الغلاف البروتيني لفيرس موزايك الخس LMV – وهو من الـ potyviruses – يعطي – كذلك – مقاومة تامة ضد فيرس واي البطاطس PVY، وهو فيرس لا يتشابه

مع فيرس LMV سوى فى ٦٦٪ من الأحماض الأمينية، بينما لم يُكسب هذا الجين النباتات أية حماية ضد فيرس إتش التبغ TEV الذى يتساوى - كذلك - مع فيرس PVY فى نسبة الأحماض الأمينية التى تتشابه مع تلك التى يحملها فيرس LMV

ومن ناحية أخرى وجد أن جين الغلاف البروتينى لفيرس موزايك وتقزم الذرة MDMV، وهو من الـ potyviruses، يكسب - كذلك - نباتات الذرة مقاومة ضد فيرس تبرقش واصفرار الذرة MCMV، وهو من مجموعة الـ carmoviruses ليس هذا فقط بل إن حقن النباتات المحولة وراثيًا - بجين الغلاف البروتينى للـ MDMV - بكلا الفيروسين وفرت حماية أكبر ضد الـ MCMV عما إذا ما حقنت النباتات المحولة وراثيًا بالفيرس الأخير منفردًا (عن Grumet ١٩٩٥).

ووجد Namba وآخرون (١٩٩٢) أن تحويل النبات *Nicotiana benthamiana* بجين الغلاف البروتينى لأى من فيروسى موزايك البطيخ ٢ (WMVII)، وموزايك الزوكينى الأصفر (ZYMV) يكسب النباتات المحولة وراثيًا مقاومة ضد كلا الفيروسين بالإضافة إلى ستة فيروسات أخرى من مجموعة الـ potyviruses، وهى فيرس موزايك الفاصوليا الأصفر (BYMV)، وفيرس واى البطاطس (PVY)، وفيرس موزايك البسلة (PeaMV)، وفيرس تبرقش الفلفل (PeMV)، وفيرس إتش التبغ (TEV). وقد توقف مستوى الحماية التى وفرتها عملية التحول الوراثى على الفيرس المحقون به، وجرعة الحقن، حيث انخفض مستوى الحماية بزيادة جرعة الحقن.

كذلك أظهرت نباتات التبغ المحولة وراثيًا بجين الغلاف البروتينى لفيرس موزايك التبغ درجة منخفضة - ولكن معنوية - من الحماية ضد فيروسات أخرى غير قريبة من هذا الفيرس، مثل فيرس إكس البطاطس، وفيرس واى البطاطس، وفيرس موزايك الخيار، وفيرس موزايك البرسيم الحجازى (عن Anderson وآخرين ١٩٨٩).

إن نباتات التبغ المحولة وراثيًا بجين الغلاف البروتينى لفيرس موزايك فول الصويا (SMV) - الذى لا يعد التبغ من عوائله - تكتسب صفة المقاومة لفيروسين غير قريبين سيرولوجيًا من فيرس موزايك فول الصويا، وهما. فيرس واى البطاطس، وفيرس إتش

التبغ TEV، وكلاهما من الـ potyviruses. هذا .. علمًا بأن الأغلفة البروتينية لكل من SMV، و PVY، و TEV تشترك معًا فى حوالى ٦٠٪ من التماثل فى تتابعات الأحماض الأمينية. كذلك فإن النباتات المحولة وراثيًّا التى تحمل جين الغلاف البروتينى لفيرس موزايك التبغ تُظهر قدرًا معنويًّا من المقاومة للإصابة بالفيروسات التى تشارك فيرس موزايك التبغ فى ٦٠٪ أو أكثر من درجة التماثل فى تتابعات الأحماض الأمينية.

وامتدادًا للاتجاه ذاته كانت نباتات التبغ المحولة وراثيًّا بجين موزايك الخيار CMV مقاومة لفيرس التبرقش المعتدل للأقحوان chrysanthemum mild mottle virus، بينما أظهرت نباتات التبغ المحولة وراثيًّا بجين موزايك الخس LMV مقاومة لفيرس واى البطاطس (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

هذا .. إلاّ أن المقاومة التى يوفرها جين الغلاف البروتينى لفيرس ما لا تكون دائمًا أكيدة ضد الفيروسات القريبة منه، ومن أبرز الأمثلة على ذلك فيروسا موزايك التبغ وموزايك الطماطم.

يتشابه فيرس موزايك الطماطم مع فيرس موزايك التبغ فى أن كليهما من مجموعة الـــ tobamovirus، إلاّ أنهما فيروسان مختلفان تمامًا ويمكن التمييز بينهما على أساس خصائصهما السيرولوجية وتركيب البروتين فيهما. وعلى الرغم من أن فيرس موزايك التبغ يمكن أن يصيب الطماطم، إلاّ أن فيرس موزايك الطماطم هو الأكثر شيوعًا فى هذا المحصول فى جميع أنحاء العالم. هذا .. ويمكن أن يتواجد الفيروسان معًا فى نبات الطماطم الواحد، إذ إن الإصابة بأحدهما لا يوفر حماية من الإصابة بالآخر.

وعلى الرغم من أن الفيروسين على درجة عالية من التماثل – قدرت بنحو ٨٨٪ – فى تتابعات النيكليوتيدات، فإن تحويل نبات الطماطم وراثيًّا بجين الغلاف البروتينى لأحدهما لا يعطى سوى قدر ضئيل من الحماية – أو لا يوفر أى حماية – ضد الفيرس الآخر، بينما يكسب هذا التحويل قدرًا كبيرًا من الحماية ضد الفيرس الذى استخدم جين غلافة البروتين فى عملية التحويل الوراثى (Sanders وآخرون ١٩٩٢).

هذا وإلى جنب ما سبقت الإشارة إليه من حالات فيروسات الرنا التى استخدمت فيها جينات الغلاف البروتينى فى هندسة نباتات وراثيًا لتكون مقاومة لتلك الفيروسات . فقد طبقت التقنية ذاتها على فيرس تجعد واصفرار أوراق الطماطم tomato yellow leaf curl virus – وهو فيرس ذات خيط مفرد من الدنا وينتقل عن طريق الذبابة البيضاء – وأمكن الحصول على نباتات طماطم تحتوى على جين الغلاف البروتينى للفيرس ومقاومة له

تتمثل المقاومة التى تتحقق عن طريق جين الغلاف البروتينى coat protein-mediated resistance فى حدوث نقص فى عدد البقع التى تتكون بالأوراق التى تحقن بالفيرس، وانخفاض فى معدل تطور المرض جهازيًا، ونقص كبير جدًا فى معدل تراكم الفيرس ذاته فى النباتات المحولة وراثيًا، مقارنة بنباتات الكنترول بعد العدوى بالفيرس المعنى. وفى أحيان كثيرة يمكن أن تصل قوة المقاومة إلى شبه المناعة (عدم حدوث أى إصابة) حتى مع استعمال تركيز عالٍ من الفيرس فى عملية الحقن به (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

ويتبين من جدول (١٤-١) أن الحماية التى يوفرها جين الغلاف البروتينى للفيرس تكون فعَّالة – غالبًا سواء أتم انتقال الفيرس للنباتات ميكانيكيًا، أم بواسطة النواقل vectors.

هذا ويبين جدول (١٤-٢) أمثلة لحالات من التحول الوراثى كان الاعتماد فيها على جين الغلاف البروتينى لفيرس ما، والفيروسات التى أصبحت النباتات التى حُوِّلت وراثيًا مقاومة لها من جراء هذا التحول. كما يبين جدول (١٤-٣) فاعلية الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على جين الغلاف البروتينى أيًا كانت المجموعات التى تنتمى إليها تلك الفيروسات.

جدول (١٤-١): الحماية التى يوفرها التحول الوراثى بجين الغلاف البروتينى ضد الحقن الطبيعى بالناقلات الفيروسية، مقارنة بالوضع فى حالة الحقن الميكانيكى (عن Grumet ١٩٩٥).

الفيرس	الناقل	الحماية ضد النقل	
		الميكانيكى	بالناقل Vector
PSR	نطاطات النباتات	لم تختبر (أ)	متوفرة
PLRV	المن	لم تختبر (أ)	متوفرة
TYLCV	الذبابة البيضاء	لم تختبر (أ)	متوفرة
CMV	المن	متوفرة	متوفرة
PVX	المن	متوفرة	متوفرة
PVY	المن	متوفرة	متوفرة
TRV	النيماتودا	متوفرة	غير متوفرة

أ- لا ينتقل الفيرس ميكانيكيًّا.

جدول (١٤-٢): أمثلة لحالات من التحول الوراثى كان الاعتماد فيها على جين الغلاف البروتينى لفيرس ما، وكيف أن هذا الجين أكسب النباتات مقاومة لفيروسات أخرى إلى جانب الفيرس صاحب الجين المستعمل فى عملية التحول الوراثى.

الفيرس مصدر جين الغلاف البروتينى	النبات المحول وراثيًّا	الفيروسات التى أصبحت النباتات مقاومة لها
TMV	التبغ	TMV
TMV	التبغ	ToMV, TMGMV
TMV	التبغ	PVX, CMV, AlMV, SHMV
TMV	الطماطم	TMV, ToMV
AlMV	التبغ	AlMV
AlMV	التبغ	PVX, CMV
AlMV	الطماطم	AlMV
AlMV	البرسيم الحجازى	AlMV
TRV	التبغ	TRV
TRV	التبغ	PEBV
TSV	التبغ	TSV

تابع جدول (١٤-٢)

الفيرس مصدر جين الغلاف البروتينى	النبات المحول وراثيًا	الفيروسات التى أصبحت النباتات مقاومـــة لها
CMV	التبغ	CMV
SMV	التبغ	PVY, TEV
BNYVV	بنجر السكر	BNYVV
PVX	التبغ	PVX
PVX	البطاطس	PVX
PVX + PVY	البطاطس	PVX, PVY
PVS	البطاطس	PVS
PLRV	البطاطس	PLRV
GCMV	التبغ	TBRV
PaRSV	التبغ	TEV
TVMV	التبغ	TVMV, TEV

جين تكاثر الفيرس

بينمـا تـوفر عمليـة التحـول الـوراثى للنباتـات باسـتخدام جـين الغـلاف البروتينـى للفيروسـات مقاومة ضد مدى واسـع نسبيًا من الفيروسـات العريبة من بعضها، فإن المقاومة ذاتها لا تكون تامة، حيث تُظهر النباتات المحولة وراثيًا أعـراض الإصـابة الفيروسـية، إلاّ أن تلك الأعراض تكون متأخرة وأقل شدة عما تكون عليه فى النباتات غير المحولـة، كما يمكن كسـر المقاومـة بـإجراء الحقـن بتركيـزات عاليـة جـدًا مـن الفـيرس، أو بالرنـا الفيروسى المجرد من الغلاف البروتينى

وفـى المقابـل . فـإن مقاومـة النباتـات المحولـة بواسـطة RNA-dependent RNA polymerase (وهو المعروف باسم replicase لأنه الإنزيم الذى ينسخ الجينوم الفيروسـى) تكون تامة وشبيهة بالمناعة، إلا أنها تكون – فقط – ضد السـلالات المماثلـة تمامًـا – فـى تتابعات الحامض النووى – لتلك التى حُصِل منها علـى الجـين المستخدم فـى التحـول الوراثى (عن Miller وآخرين ١٩٩٧)

جدول (١٤-٣) حالات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات التى استخدمت فيها جينات الغلاف البروتينى الفيروسى حتى بدايات عام ١٩٩٤ (عن Grumet ١٩٩٥).

المجموعة الفيروسية	الفيرس	اسمه المختصر	النوع المحول وراثيًا
Alfalfa mosic virus group	Alfalfa mosaic virus	AlMV	التبغ – الطماطم – البرسيم الحجازى
Carlavirus	Potato virus S	PVS	البطاطس
Cucumovirus	Cucumber mosaic virus	CMV	التبغ – الخيار – القاوون
Geminivirus	Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV	الطماطم
Ilarvirus	Tobacco streak virus	TSV	التبغ
Luteovirus	Potato leaf froll virus	PLRV	البطاطس
Nepovirus	Arabis mosaic virus	ArMV	التبغ
	Grapevine chrome mosaic virus	GCMV	التبغ
Potexvirus	Cymbidium mosaic virus	CyMV	*N. benthamiana*
	Potato virus X	PVX	التبغ – البطاطس
Potyvirus	Bean yellow mosaic virus	BYMV	*N. benthamian*
	Lettuce mosaic virus	LMV	التبغ
	Maize dwarf mosaic virus	MDMV	الذرة
	Papaya ringspot virus	PRSV	التبغ – الباباظ
	Plum pox virus	PPV	*N. clevelandii*
	Potato virus Y	PVY	البطاطس
	Soybean mosaic virus	SMV	التبغ
	Watermelon mosaic virus	WMV	*N. benthamiana*
	Zucchini yellow mosaic virus	ZYMV	*N. benthamiana* – القاوون – التبغ
Tenuivirus	Rice stripe virus	RSV	الأرز
Tabamovirus	Tobacco mosaic virus	TMV	التبغ – الطماطم
Tobravirus	Tabacco rattle virus	TRV	التبغ
Tospovirus	Tomato spotted wilt virus	TSWV	التبغ

جاء اكتشاف خاصية قدرة جين الـ replicase الفيروسي على إكساب النباتات المحولة وراثيًّا به مقاومة له . جاء من تجارب صممت لاختبار ما إذا كانت الوحدة 54 kD من إنزيم الـ replicase الخاص بفيرس موزايك التبغ تلعب دورًا في انقسام الفيرس أم لا، حيث كانت المفاجأة أن نباتات التبغ المحولة وراثيًّا بنسخه من الـ cDNA لهذا الجزء من جين الـ replicase كانت على درجة عالية من المقاومة لفيرس موزايك التبغ حتى عندما وصل تركيز اللقاح إلى ١٠٠٠ ضعف التركيز الذى يقاومه جين الغلاف البروتيني، وحتى مع عدم القدرة على اكتشاف وجود هذا البروتين – 54kD – في تلك النباتات

وقد تبين أن البروتين ٥٤ كيلو دالتون 54-kD protein – وليس الرنا الخاص به – هو المسئول عن تلك الحماية التى تقترب من مستوى المناعة. ويعتقد بأن تراكم هذا البروتين في النباتات المحولة وراثيًّا قد يعطل دورة تكاثر الفيرس

وكما في حالة التحول الوراثي باستعمال جين الغلاف البروتيني، فإن المقاومة التي يوفرها جين الـ replicase تختلف من سلالة محولة وراثيًّا لأخرى، إلاّ أن المستوى العام للمقاومة التى يوفرها جين الـ replicase أعلى من تلك التي يوفرها جين الغلاف البروتيني (عن Grumet ١٩٩٥).

هذا وتعرف – حاليًا – عدة حالات تحققت فيها المقاومة عن طريق جين الـ replicase (جدول ١٤–٤)، منها تلك الخاصة بفيروسات. إكس البطاطس PVX، وواى البطاطس PVY، و التلون البنى المبكر للبسلة pea early browning، وموزايك الخيار CMV ومن بين تلك الحالات ما حدث فيها التحول الوراثي بجين الـ replicase الفيروسي الكامل، ومنها ما استخدم فيها صورًا مقتضبة truncated أو مطفرة mutated من ذلك الجين، وذلك بتعديل أو فصل أجزاء خاصة منه (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥، و Grumet ١٩٩٥).

ومن الأصناف التجارية التي حدث فيها التحول الوراثي بتلك التقنية صنف البطاطس Newleaf Plus الذى يحتوى على كل من. جين بروتين الانقسام replicase

protein gene لفيرس التفاف أوراق البطاطس، وجين الـ Bt من البكتيريا *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (عن Duncan وآخرين ٢٠٠٢).

جدول (٤-٤): الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على جينات فيروسية أخرى غير جين الغلاف البروتينى (عن Grumet ١٩٩٥).

الجين (البروتين)	المجموعة الفيروسية	الفيرس	النوع النباتى المحول وراثيًا
Replicase	**Cucumovirus**	**CMV**	التبغ
	Potexvirus	**PVX**	التبغ
	Potyvirus	**PVY**	التبغ
	Tobamovirus	**TMV**	التبغ
	Tobravirus	**PEPV**[أ]	***Nicotiana benthamiana***
	Tombusvirus	**CyRSV**[أ]	***N. benthamiana***
بروتين الحركة	**Tobamovirus**	**TMV**	التبغ
Protease	**Potyvirus**	**PVY**	التبغ

أ- **pea early browning virus = PEBV**، و **cymbidium ringspot virus = CyRSV**.
للتعرف على الأسماء الكاملة لباقى الفيروسات التى وردت رموزها فى الجدول .. يراجع جدول (١٤-٣).

جين حركة الفيرس

أوضحت الدراسات التى أجريت على فيرس موزايك التبغ أن حركة الفيرس تعتمد على بروتين فيروسى خاص (هو الـ 30 kD movement protein) يقوم بتعديل قطر الثقوب التى تمر منها الروابط البروتوبلازمية التى تربط الخلايا المتجاورة بعضها ببعض؛ الأمر الذى يسهل عملية انتقال الفيرس. وعندما عُدِّلَت نباتات التبغ وراثيًا بالجين الكامل لحركة فيرس موزايك التبغ فإنها لم تكن مقاومة للفيرس، إلا أن تعديل النباتات باستعمال طراز طفرى من هذا الجين جعلها مقاومة.

وعلى خلاف المقاومة التى تنتج من استعمال جين الـ replicase، فإن المقاومة التى يحدثها جين الحركة ليست على درجة عالية من التخصص؛ بما يعنى إمكان استخدام جين الحركة فى الحصول على نباتات مقاومة لعدة فيروسات (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

لقد أظهرت نباتات التبغ التى حولت وراثيًا بجين الحركة لفيرس brome mosaic virus أظهرت مقاومة ضد فيرس موزايك التبغ الذى لا يمت للفيرس الأول بصلة قرابة كذلك أظهرت نباتات التبغ التى عدلت وراثيًّا بطفرة لجين الحركة الخاص بفيرس موزايك التبغ مقاومة ضد عدد من الفيروسات غير القريبة منه (عن Dickinson ٢٠٠٣)

كما أنتجت نباتات بطاطس محولة وراثيًا تحتوى على صور طفرية من جين فيرس التفاف أوراق البطاطس ORF4، وهو الجين الذى يتحكم فى إنتاج البروتين pr17 الخاص بحركة هذا الفيرس فى النبات. وأظهرت النباتات التى حولت وراثيًّا نقصًا جوهريًا فى أعداد هذا الفيرس فى النبات، كما كانت مقاومة – كذلك – لكل من فيرس واى البطاطس، وفيرس إكس البطاطس (Tacke وآخرون ١٩٩٦)

جين البروتين المتعدد الفيروسى

يشفر جينوم بعض الفيروسات – مثل فيرس واى البطاطس PVY – لتكوين جزئ بروتينى واحد كبير – يطلق عليه اسم البروتين المتعدد بروتييز polyprotein protease – بدلاً من تكوين عدة منتجات بروتينية منفصلة، وبعد أن يتكون فإنه يخضع لـ proteolytic process ينتج عنها المنتجات البروتينية التى يحتاجها الفيرس ولقد أدت الدراسات التى أجريت على النباتات المحولة وراثيًا (فيما يتعلق بالعوامل المتحكمة فى الـ proteolytic process للـ polyprotein) . إلى اكتشاف أن النباتات المهندسة وراثيًّا لتعبر عن الـ protease الفيروسى لأى من فيرس واى البطاطس أو فيرس تبرقش عروق التبغ tobacco vein mottling virus أظهرت درجة عالية للمقاومة لتلك الفيروسات وقد كانت تلك المقاومة على درجة عالية من التخصص على مستوى السلالة المستعملة، ويبدو أنها تعارضت مع عملية proteolysis للـ polyprotein، مما أدى إلى إحداث اضطراب فى دورة حياة الفيرس (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

شفرة الرنا الفيروسى العكسية

اتبعت استراتيجية شفرة الرنا العكسية antisense RNA strategy فى عمليات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بنقل تتابعات رنا إلى النبات تعبر عن شفرة الرنا

الفيروسى العكسية، أى بنقل خيط رنا ذات تتابعات متممة للرنا الفيروسى، حيث يلتحم الرنا ذو الشفرة المضادة مع الرنا الرسول المقابل، مما يؤدى إلى منع استنساخه، وتعرف الحماية التى توفرها تلك التقنية باسم antisense mediated protection

نجد فى النباتات العادية أن خيطا واحدًا من الدنا - يطلق عليه اسم antisense strand - تكون تتابعاته النيكليوتيدية متممة complementary للتتابعات فى الخيط الآخر الذى يعرف باسم sense strand أما فى تكنولوجيا الـ antisense RNA فإن جين الـ antisense يُنتج بإعكاس توجه منطقة النسخ بالنسبة للـ promotor. وبذا، يصبح الخيط المسئول عن الشفرة الوراثية sense strand بمثابة antisense، وهو الذى يتم نسخه ويؤدى تواجد الجين الأصلى وجين الـ antisense معا إلى إنتاج antisense RNA، و sense RNA، وكلاهما مكمل لبعضهما البعض حيث يقترنان كـ رنا ذات خيط مزدوج، ومن ثم لا يتوفر رنا رسول mRNA لعملية النسخ، مما يؤدى إلى وقف نشاط (إسكات silencing) الجين الطبيعى (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

وقد كانت تلك الطريقة فعالة سواء استخدمت الشفرة المضادة لجين الغلاف البروتينى، أم لجين الـ replicase الفيروسى ونظرًا لأن نظام الحماية يختلف فى الحالتين، فقد يكون من الممكن رفع مستوى المقاومة بنقل الشفرة المضادة لكلا الجينين

هذا إلاّ أنه فى كل من حالات فيرس موزايك الخيار، وفيرس إكس البطاطس، وفيرس موزايك التبغ لم تُحدث شفرة الرنا العكسية حماية من الإصابة إلاّ فى التركيزات المنخفضة فقط من اللقاح الفيروسى، وكانت أقل كفاءة من عملية التحول الوراثى باستعمال جين الغلاف البروتينى

وبالمقارنة . فإن الحماية من الإصابة بفيرس التفاف أوراق البطاطس تساوت فى كل من النباتات المحولة وراثيًا بجين الغلاف البروتينى للفيرس أو بشفرته العكسية

ومن مميزات التحول الوراثى بالشفرة العكسية بدلا من شفرة الغلاف البروتينى، أن النبات لا ينتج الغلاف البروتينى للفيرس، وبذا تتوفر طاقته للنمو الطبيعى (عن Nascari & Montanelli ١٩٩٧)

ويبين جدول (١٤-٥) أمثلة لفيروسات أمكن مقاومتها بإجراء عملية التحول الوراثى بالاعتماد على الشفرة العكسية للرنا الفيروسى.

شفرة عادية – ولكن معيبة – من الرنا الفيروسى

أمكن هندسة نباتات مقاومة للفيروسات باستعمال خيوط رنا عادية (غير معكوسة، أى مُشفِرّة)، ولكنها معيبة defective، وذلك من خلال تحويرها بطريقة تجعلها غير قادرة على نقل الشفرة. ويبين جدول (١٤-٥) أمثلة لحالات اعتمد فيها التحول الوراثى على تلك التقنية.

جدول (١٤-٥). هندسة النباتات لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على تتابعات رنا فيروسى viral-derived RNA sequences (عن Grumet ١٩٩٥).

الرنا	المجموعة الفيروسية	الفيرس	النوع النباتى المحول وراثيًا
شفرة فيروسية عكسية	Cucumovirus	CMV	التبغ
	Geminivirus	TGMV[أ]	التبغ
	Luteovirus	PLRV	البطاطس
	Potexvirus	PVX	التبغ
	Potyvirus	BYMV	*Nicotiana benthamiana*
		PVY	التبغ
		TEV[أ]	التبغ
		ZYMV	القاوون – التبغ
	Tobamovirus	TMV	التبغ
	Tospovirus	TSWV[أ]	
شفرة غير عكسية ولكن معيبة	Potyvirus	TEV	التبغ
	Tobamovirus	TMV	التبغ
	Ttospovirus	TSWV	التبغ
	Tymovirus	TYMV[أ]	لفت الريت

أ – TGMV = tomoto golden mosic virus، و TEV = tobacco etch virus، و TSWV = tomato spotted wilt virus، و TYMV = turnip yellow mosaic virus؛ وللأسماء الكاملة للفيروسات الأخرى التى وردت رموزها فى الجدول يراجع جدول (١٤-٣)

الرنا الفيروسى التابع وجزيئات الرنا المشوهة المعيقة لفعل الفيرس

على الرغم من بساطة تركيب الفيروسات واعتمادها الكامل على خلايا العائل فى كافة نشاطها الأيضى .. فإن مجموعات عديدة من الفيروسات يمكنها أن تكتسب تتابعات لحامض نووى يكون تابعًا لها، ويمكن اعتبارها – مجازًا – متطفلات جزيئية molecular parasites. هذه التتابعات – والتى تتضمن التوابع الفيروسية satellites viruses، والجزيئات المشوهة المعيقة لفعل الفيرس defective interfering particles (والتى تعرف باسم helper viruses) – ليست ضرورية لعمل الفيرس، ويمكنها تثبيط ظهور أعراض الإصابة، وتكاثر الفيرس ذاته.

وقد حظيت تلك المتطفلات الجزيئية باهتمام الباحثين الساعين إلى هندسة نباتات مقاومة للفيروسات. ويبين جدول (١٤-٦) أمثلة للفيروسات التى استعملت معها تلك التقنية.

جدول (١٤-٦): الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات باستعمال المتطفلات الفيروسية (عن Grumet ١٩٩٥).

المتطفل الفيروسى	المجموعة الفيروسية	الفيرس	العائل المحول وراثيًا
التوابع Satellites	Cucumovirus	CMV	التبغ – الطماطم
	Nepovirus	TobRV(ب)	التبغ
الجزيئات المشوهة المعيقة(أ)	Geminivirus	ACMV(ب)	*Nicotiana benthamiana*
		BCTV(ب)	*N. benthamiana*
	Tombusvirus	CyRSV	*N. benthamiana*

أ – Defective interfering particles .. وهى جزيئات رنا مشوه تعيق عمل الفيرس الأصلى (helper virus).

ب – tobacco ringspot virus = TobRV، و African cassava mosaic virus = ACMV، و beet curly top virus = BCTV؛ للأسماء الكاملة لباقى الفيروسات التى وردت رموزها فى الجدول .. يراجع جدول (١٤-٤).

يوجد التابع الفيروسى فى عدة مجاميع من الفيروسات التى يوجد بها الحامض النووى على صورة رنا. وهو - أى التابع - جزىء مفرد من الرنا يحتوى على نحو ٣٠٠-٤٠٠ نيوكليوتيدة. وقد اعتبر البعض هذه التوابع كطفيليات للفيروسات، لأنها تستفيد من آلية تكاثر الفيرس، وتغلف نفسها بالغلاف البروتينى للفيرس، ولكنها ليست ضرورية لتكاثر الفيرس ذاته. وقد جرب هذا التطبيق للهندسة الوراثية مع كل من فيروسى موزايك الخيار، وبقع التبغ الحلقى فى التبغ، حيث أظهرت النباتات المحولة وراثيًا أعراضًا مرضية أقل شدة - مما فى غير المحولة - عندما تعرضت للإصابة بالفيرس الأصلى، بينما لم يتأثر نموها بعملية التحول الوراثى

وتتميز هذه الطريقة بأن تعرض النباتات المحولة وراثيًا للإصابة بالفيرس الذى ينتمى إليه التابع يؤدى - تلقائيًا - إلى زيادة أعداد التابع فى النباتات، وزيادة الوقاية التى يوفرها ضد الفيرس وبالمقارنة . فإن فاعلية نقل الجين المسئول عن تمثيل الغلاف البروتينى للفيرس إلى النبات تتناسب طرديًا مع الكمية الممثلة من هذا الغلاف فى النبات، وهو ما يتطلب وجود جرعة كبيرة من هذا الجين فى النبات المحول وراثيًا

ومن أهم عيوب هذا التطبيق للهندسة الوراثية ما يلى:

١ - لا تتوفر التوابع فى جميع الفيروسات.

٢ - لا يمكن التنبؤ دائما بتأثير التوابع فى النباتات المحولة وراثيًا، فبينما هى تقلل كثيرًا من شدة الأعراض المرضية فى معظم الحالات، فإنها تزيدها فى حالات أخرى قليلة (عن Grumet ١٩٩٠)

وقد وجد أن الحماية التى يوفرها الرنا التابع لفيرس موزايك الخيار كانت فعالة فى مكافحة الفيرس فى كل من حالتى الحقن بالمن وميكانيكيًا

أما بالنسبة للتحول الوراثى الذى يجرى باستعمال جينوم الـ helper virus، فقد أظهرت الدراسات أن المقاومة لا تظهر فى الأوراق التى تحقن بالفيرس، وإنما فى الأوراق التالية لها فى الظهور، وأن درجة الحماية لا تتوقف على تركيز الفيرس

المستخدم فى الحقن، ولا ترتبط بدرجة التعبير عن تتابعات الحامض النووى (الـ helper virus) المستخدم فى التحويل الوراثى (عن Grumet ١٩٩٥).

إن من أكبر مخاطر تقنية التحول الوراثى باستعمال الجينات الخاصة بالتوابع الفيروسية satellite viruses والـ helper viruses أنها لا تكون دائمًا مخفضة لأعراض الإصابات التى تحدثها الفيروسات الأصيلة، فقد تحدث بها طفرات تجعل تأثيرها منشطًا للفيرس الأصلى ليصبح أشدُّ ضراوة كذلك فإن الفيرس التابع لا يكون تأثيره بالضرورة واحدا فى كل عوائله، فهو قد يكون مثبطًا لفعل الفيرس الأصلى فى أحد الأنواع النباتية، ومنشطًا له فى نوع آخر (عن Scholthof وآخرين ١٩٩٣).

هذا .. ويبين جدول (١٤-٧) مقارنة بين الطرق المختلفة للتحول الوراثى باستعمال جينات مختلفة ذات أصل فيروسى.

جدول (١٤-٧): مقارنة بين الطرق الرئيسية لهندسة النباتات لمقاومة الفيروسات (عن Grumet ١٩٩٠).

الطريقة	المزايا	العيوب
الغلاف البروتينى	– قابلة للتطبيق بصورة عامة – فعالة بصورة مقبولة	– تعتمد المقاومة – غالبًا – على مستوى التعبير عن الغلاف البروتينى فى النبات وشدة الإصابة
جينات السلالات الفيروسية الضعيفة	– توفر مستوى عالٍ من القاومة	– قد تتسبب فى نقص المحصول أو جودته
	– تستمر القاومة وتزداد ذاتيًا	– قد تطفر إلى سلالة أشد ضراوة – قد تتفاعل مع فيروسات أخرى؛ لتسبب أعراضًا شديدة
الكود المعكوس antisense	– قابلة للتطبيق بصورة عامة	– ليست شديدة الفاعلية
الرنا التابع	– تستمر المقاومة وتزداد ذاتيًا بعد حدوث الإصابة الفيروسية	– لا يمكن – دائمًا – التنبؤ بتأثير التابع
	– توفر مستوى عالٍ من القاومة	– قد تطفر التوابع؛ لتسبب أعراضًا أشد

التحول الوراثى بجينات من العائل تختص بمقاومة الفيروسات

الجينات التى تشفر للإنزيمات ذات العلاقة بعملية ظهور المرض

إن أكثر مظاهر المقاومة للفيروسات فى النباتات هى الاستجابة التى تعرف باسم فرط الحساسية hypersensitivity، وهى التى يُستثار حدوثها عندما يتعرف النبات العائل على الكائن المرض – وهو الفيرس فى حالتنا تلك – مما يؤدى إلى موت مبرمج لخلايا العائل حول الموضع الأولى للإصابة ولقد وجد أن حادثة التعرف تلك تعتمد – فى بعض الأحيان – على جينات مفردة فى العائل ويؤدى تعرف النبات على الكائن المرض – بالتالى – إلى حث عدد كبير من الجينات الأخرى المرتبطة بالدفاع ضد المسببات المرضية حثها إلى النشاط وبينما تعمل بعض تلك الجينات موضعيًا فى مكان الإصابة لتتسبب فى موت الخلايا المرافق لاستجابة فرط الحساسية، فإن جينات أخرى كثيرة يظهر تأثيرها جهازيًا، وتشترك فى تطور حالة من المقاومة – أعلى من الحالة العادية – فى أجزاء النبات، وهى التى تعرف باسم المقاومة الجهازية المكتسبة systemic acquired resistance، ومن بين أهم هذه الجينات التى تشترك فى إحداث حالة المقاومة الجهازية المكتسبة تلك التى تكون مسئولة عن إنتاج ما تعرف بالبروتينات المرتبطة بتولد أو نشوء المرض pathogensis-related proteins. ولقد أمكن التعرف على عديد من تلك البروتينات، وهى تضم ما لايقل عن عشرة بروتينات رئيسية حامضية acidic تتواجد أساسًا فى البروتوبلاست، بالإضافة إلى مجموعة من البروتينات الأساسية التى تتواجد فى الفجوات العصارية وقد تبين أن عددًا كبيرًا من هذه البروتينات يظهر بها نشاط لكل من الـ glucanase، و الـ chitinase

وفى التبغ وجد أن المقاومة الجهازية المكتسبة التى تُحدثها العدوى بفيرس موزايك التبغ لا تكسب النباتات حماية ضد مزيد من لقاحات الفيرس ذاته – فقط – ولكن - كذلك - ضد فيروسات أخرى، ومسببات مرضية أخرى فطرية وبكتيرية. ونظرا لأن المقاومة الجهازية المكتسبة، وتمثيل البروتينات المرتبطة بتولد المرض يحدثان فى آن واحد، فقد اقتُرح أن تلك البروتينات تلعب دورًا نشطًا فى عملية الدفاع. ولقد جاء أول تأييد لذلك الاستنتاج عندما لوحظ أن رش أوراق التبغ بحامض السلسيلك يحث تمثيل

مجموعة من البروتينات المرتبطة بتولد المرض، وأن ظهورها يواكب تطور حدوث المقاومة الجهازية المكتسبة. هذا مع العلم بأن حامض السلسيلك يعد من النواتج الأيضية النباتية الطبيعية، ووجد أنه يلعب دورًا جوهريًا في تطور المقاومة الجهازية المكتسبة. ولقد تبين أن النباتات المهندسة وراثيًا لجعلها قادرة على تحليل حامض السلسيلك الطبيعي لا تكون قادرة على تطوير مقاومة جهازية مكتسبة.

ومن المعتقد أن التعبير عن الجينات التي تشفر للبروتينات المرتبطة بتولد المرض في النباتات هو أقصر الطرق لتقييم ما إذا كان ظهورها مجرد ارتباط بتطور المقاومة الجهازية المكتسبة، أم أنها تلعب دورًا نشطًا في المقاومة (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

جينات المقاومة الطبيعية في العائل

نعني بجينات المقاومة الطبيعية في العائل تلك التي تكون خاصة بأصناف معينة ضد فيروسات معينة، حيث يكون النوع النباتي الذي تنتمي إليه تلك الأصناف قابل للإصابة - بصورة عامة - بالفيروسات التي تقاومها تلك الأصناف، وتلك حالة تختلف عن كل من حالة فرط الحساسية التي أسلفنا بيانها، وحالة مقاومة نوع نباتي ما لجميع سلالات فيرس ما. وجدير بالذكر أن حالة المقاومة التي نعنيها هنا هي التي اعتمد عليها مربو النباتات لسنوات عديدة في تربية أصناف مقاومة للفيروسات، وفي معظم الأحيان كانت تلك المقاومة بسيطة، بينما كانت حالات المقاومة الكمية أو التي يتحكم فيها عدد محدود من الجينات oligogenic resistance هي الاستثناء للقاعدة

وعلى الرغم من التعرف على عديد من تلك الجينات فإنه لا يعرف عن غالبيتها شيئًا، باستثناء تحديد الموقع الكروموسومي التقريبي لبعضها، الأمر الذي أعاق الاستفادة منها في عمليات التحول الوراثي.

ولقد كان الجين التبغ N أول جينات المقاومة للفيروسات التي تم عزلها لأجل الاستخدام في عمليات التحول الوراثي. يوفر هذا الجين مقاومة لفيرس موزايك التبغ ومعظم الفيروسات الأخرى من عائلة الـ tobamovirus ونظرًا لأن سلالات فيرس

موزايك التبغ يمكنها إصابة أكثر من ٢٠٠ نوع نباتي، بما في ذلك معظم الباذنجانيات، فإنه يتبين مدى أهمية تحويل النباتات وراثيًا بهذا الجين. كانت البداية بتحويل طماطم قابلة للإصابة بفيرس موزايك التبغ بالجين N، مما أدى إلى إكسابها صفة المقاومة

ومن بين الحالات القليلة التي دُرست فيها تلك الجينات على المستوى الجزيئي وجرت محاولات للاستفادة منها جين المقاومة Rx في البطاطس، الذي يضفي حالة المقاومة القصوى extreme resistance – وهي حالة تقترب من المناعة immunity – ضد فيرس إكس البطاطس، حيث يُوقف الجين – تماما – تكاثر الفيرس

تبدأ تفاعلات حالة المقاومة القصوى عندما يبدأ البروتين المسئول عن إنتاجه الجين Rx التعرف على موقع معين من الغلاف البروتيني للفيرس، حيث يتوقف تكاثر الفيرس وما أن يُستَحث الجين على إظهار نشاطه في المقاومة فإن تلك المقاومة تكون فعالة – بذات الدرجة – في تثبيط تكاثر فيروسات أخرى لا علاقة تربطها بفيرس إكس البطاطس ولقد كللت بنجاح محاولات التحويل الوراثي لكل من البطاطس، و *N benthamiana*، و *N tobacum*، وكانت النباتات التي حولت وراثيًا تامة المقاومة (عن Kavanagh & Spillance ١٩٩٥، و Walsh ٢٠٠٠)

التحول الوراثي بجينات نباتية المصدر تشفر لبروتينات مضادة للفيروسات

توجد فئة من البولي ببتيدات تعرف باسم مضادات الفيروسات، أو البروتينات المثبطة للريبوسومات ribosome-inactivating proteins، وأمكن التعرف عليها في عدد من الأنواع النباتية، منها حنيشة عنب الذئب أو عنب الثعلب pockeweed (وهي *Phytolacca americana*)، التي أمكن التعرف فيها على ثلاثة أنواع من البروتينات المضادة للفيروسات pockweed antiviral proteins (اختصارا PAPs)، هي PAP ويوجد في الأوراق الربيعية، و PAPII ويوجد في الأوراق الصيفية، و PAPS ويوجد في البذور، ويرجع دورهم في تثبيط الريبوسومات إلى قدرتهم على تحوير الرنا الريبوسومي، ومن ثم إحداث تعرض مع ترجمة شفرة البولي ببتيدة وقد أوضحت الدراسات أن النشاط المضاد للفيروسات لتلك البروتينات يحدث نتيجة لدخولها في الـ cytosol (من

الحجيرات التى تكون محجوزة فيها؛ فيما يعرف باسم compartmentalization) حيث تعمل على تثبيط ريبوسومات العائل.

وقد أوضحت الدراسات - كذلك - أن عدوى النباتات بثلاثة فيروسات مختلفة - فى آن واحد - هى فيرس إكس البطاطس، وفيرس واى البطاطس، وفيرس موزايك الخيار - أن الـ PAP تسبب فى مقاومة النباتات للعدوى الميكانيكية بكل من فيرس إكس البطاطس وفيرس واى البطاطس، وأن مستوى المقاومة ارتبط إيجابيًّا بمستوى الـ PAP فى السلالات المحولة وراثيًّا، وأن السلالات التى احتوت على مستوى عالٍ من الـ PAP كانت مقاومة - كذلك - لفيرس موزايك الخيار (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

ومن الأمثلة الأخرى لحالات التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات، والتى استخدمت فيها جينات نباتية مضادة للفيروسات، ما يلى:

١ - الجين ribonuclease الذى حُصل عليه من الخميرة واستعمل فى تحويل البطاطس وراثيًّا، حيث جعلها مقاومة لفيرويد الدرنة المغزلية spindle tuber viroid.

٢ - الجين β-1,3-glucanase الذى استعمل فى التحويل الوراثى لعديد من النباتات، حيث جعلها مقاومة لعديد من الفيروسات (عن Bent & Yu ١٩٩٩).

التحول الوراثى بجينات من الثدييات

جينات تكوين الأجسام المضادة

إن جهاز المناعة الذى تتميز به الثدييات يوفر لها مراقبة فعالة ضد المسببات المرضية التى قد تهاجمها، بإكسابها القدرة على إنتاج أعداد كبيرة من الأجسام المضادة antibodies الخاصة بأنتيجينات معينة. ولقد توجه تفكير الباحثين إلى أن تحويل النباتات وراثيًّا بالجينات المسئولة عن تكوين تلك الأجسام المضادة ربما يفيد فى حمايتها من مختلف الإصابات المرضية.

ولقد كانت المحاولات الأولى للتعبير عن الـ monoclonal antibodies (اختصارًا: mAbs) فى النباتات واستمرار بقاء مستوى عالٍ من النشاط الرابط binding activity

[للأنتيجينات] فى النباتات المحولة وراثيًا .. كانت مخيبة للآمال، وكان مرد ذلك إلى استعمال cDNAs – للـ mAbs – التى أشفرت لكل جزئ الجسم المضاد الطبيعى، وهو الذى تبين عدم ثباته فى الخلايا النباتية. ولقد حُلّت تلك المشكلة بدرجة كبيرة بتطوير أجسام مضادة صغيرة mini antibodies تحتوى – فقط – على الأجزاء الفعالة الرئيسية الضرورية للتعرف على الأنتيجين والارتباط معه، والتى أظهرت قدرًا أكبر من التبات فى الخلايا النباتية

ولقد اتبعت تلك الطريقة فى تطوير نباتات تبغ محولة وراثيًا على درجة عالية من المقاومة للعدوى لفيرس تبرقش وتغضن الخرشوف artichoke crinkle mottle virus، حيث احتوت على mAb ذات سلسلة واحدة single chain mAb موجهة نحو الغلاف البروتينى للفيرس، كانت هى السبب فى المقاومة التى ظهرت على صورة تأخر فى ظهور أعراض الإصابة بمقدار ٥–١٤ يومًا بعد عدوى النباتات بتركيز من الفيرس وصل إلى ١٠٠٠ ضعف الحد الأدنى للتركيز الذى يلزم لإحداث الإصابة فى النباتات العادية. وتبين أن تلك المقاومة كانت بسبب حدوث ربط binding للفيرس مع الـ mAbs (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥)

إنزيم الثدييات oligoadenylate synthase

تفرز الخلايا الحيوانية مركبات تعرف باسم إنترفيرونات interferons أثناء تكاثرها وازديادها عدديًا، وذلك استجابة لمؤثرات خارجية، وخاصة الإصابات الفيروسية ليس لهذه الأنترفيرونات – بذاتها – أى نشاط مضاد للفيروسات، ولكنها تستحث تمثيل بروتينات إضافية هى التى تقوم – مباشرة – بتثبيط تكاثر الفيرس، ومنها 2′-5′ oligoadenylate synthetase ينشط هذا الإنزيم فى وجود رنا مزدوج يتكون أثناء تكاثر فيروسات الرنا وما أن ينشط الإنزيم حتى يقوم بعمل بلمرة للـ ATP إلى صورة oligomeric تقوم – بدورها – بتنشيط ribonuclease معين، ليقوم بتحليل الرنا الفيروسى والخلوى

وتوجد أدلة على أن بعض مكونات ذلك المسار المضاد للفيروسات توجد فى

النباتات؛ مما يفيد بأن التعبير عن الـ cDNA الخاص بالـ oligoadenylate synthetase الذى يوجد بالثدييات ربما يكسب النباتات التى تحول وراثيًا به مقاومة غير متخصصة ضد الفيروسات (عن Kavanagh & Spillance ١٩٩٥).

ولقد أمكن تحويل البطاطس وراثيًا بجين الثدييات الخاص بإنتاج الإنزيم 2′-5′ oligoadenylate synthetase، الذى يعد أحد مكونات نظام الإنترفيرون الذى يعمل فى الثدييات كمضاد للفيروسات. عُزل هذا الجين من الفئران، ونقل إلى البطاطس بالاستعانة ببكتيريا الأجروباكتيرم. وقد كانت نباتات البطاطس التى عُبِّرَ فيها عن الجين – والتى حقنت بفيرس إكس البطاطس – أقل احتواء على هذا الفيرس فى كل من الأوراق والدرنات عما كان عليه الحال فى النباتات غير المحولة وراثيًا (Truve وآخرون ١٩٩٣).

كما أوضحت الدراسات أن الإنترفيرون interferon الآدمى ينشط – كذلك – ضد الفيروسات النباتية؛ فقد وفر – فى إحدى الدراسات – حماية للنباتات من الإصابة بفيرس موزايك التبغ، إلاّ أن دراسات أخرى كثيرة أوضحت عدم جدواه فى توفير تلك الحماية. وقد ترجع تلك الاختلافات إلى التركيز العالى نسبيًا للإنترفيرون الذى استخدم فى المعاملة؛ إذ إن التركيزات المنخفضة فقط هى التى تكون نشطة فى النباتات (عن Walsh ٢٠٠٠).

استعراض للإنجازات فى مجال التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات

نقدم فى الجداول الأربعة التالية استعراضًا لما تم إنجازه فى مجال التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات. يظهر فى جدول (١٤–٨) عرضًا لعدد الحالات التى استخدمت فيها مختلف جينات المقاومة للفيروسات، وبداية تطبيق كل حالة منها، وذلك حتى عام ١٩٩٥. وفى جدول (١٤–٩) نقدم قائمة بمختلف الجينات التى حُصل عليها من فيروسات معينة، والتى استعملت فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة تلك الفيروسات فى عدد من الأنواع النباتية. ويقدم جدول (١٤–١٠) قائمة بعدد الأنواع المحصولية التى أنتجت فيها نباتات مقاومة للفيروسات حتى بداية عام ١٩٩٥. أما جدول (١٤–١١)

فتظهر به حالات التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات التى أجريت عليها اختبارات حقلية فى الولايات المتحدة حتى عام ١٩٩٩.

جدول (١٤-٨): أنواع الجينات التى استعملت فى هندسة نباتات وراثيًا لمقاومة الفيروسات، ومصادرها حتى بداية عام ١٩٩٤ (عن Grumet ١٩٩٥).

نوع الجين	مصدر الجين	عام نشر أول حالة	عدد الحالات
Coat protein	فيروسى	١٩٨٦	٤٤
Satellite	فيرس تابع	١٩٨٧	٦
Antisense, sense defective RNAs	فيروسى	١٩٨٨	١٥
Replicase	فيروسى	١٩٩٠	٨
Defective-interfering sequences	فيروسى	١٩٩٠	٣
Movement protein	فيروسى	١٩٩٣	١
Protease	فيروسى	١٩٩٣	١
Antibody	حيوانى	١٩٩٣	١
Interferon-related protein	حيوانى	١٩٩٣	١

جدول (١٤-٩) جينات المقاومة للفيروسات التى استعملت فى عمليات التحول الوراثى حتى عام ١٩٩٧ (عن Nascari & Montanelli ١٩٩٧).

النبات	الفيرس	الجين
التبغ	Tobacco mosaic virus	Coat protein
التبغ	Tobacco ringspot virus	Satellite RNA
التبغ	Cucumber mosaic virus	Satellite RNA
التبغ	Alfalfa mosaic virus	RNA 4
التبغ – الطماطم	Alfalfa mosaic virus	Coat protein
التبغ	Cucumber mosaic virus	CP/antisense RNA
التبغ	Potato Virus X	CP/antisense RNA
الطماطم	Tobacco mosaic virus	Coat protein
الطماطم	Tomato mosaic virus	Coat protein
التبغ	Tobacco rattle virus	Coat protein

تابع جدول (١٤-٩).

النبات	الفيرس	الجين
التبغ	Tobacco streak virus	Coat protein
البطاطس	Potato virus X	Coat protein
التبغ	Tobacco mosaic virus	Antisense RNA
التبغ	Soybean mosaic virus	Coat protein
التبغ	Tobacco mosaic virus	Nonstructural
البطاطس	Potato leaf roll virus	Coat protein
البطاطس	Potato virus Y	Coat protein
Nicotiana debneyii	Potato virus S	Coat protein
N. benthamiana	African cassava mosaic virus	Defective DNA
التبغ	Tomato spotted wilt virus	Coat protein
البرسيم الحجازى	Alfalfa mosaic virus	Coat protein
البطاطس	Potato leaf roll virus	CP/antisense RNA
التبغ	Papaya ringspot virus	Coat protein
البطاطس	Potato virus S	Coat protein
التبغ	Arabis mosaic virus	Coat protein
التبغ	Cymbidium mosaic virus	Coat protein
المشمش	Plum pox virus	Coat protein
Dendrobium	Papaya ringspot virus	Coat protein
N. benthamiana	Watemelon mosaic virus II	Coat protein
N. benthamiana	Zucchini yellow mosaic virus II	Coat protein
Nicotiana spp.	Plum pox virus	Coat protein
الطماطم	Cucumber mosaic virus	Satellite RNA

جدول (١٤-١٠): الأنواع النباتية التى أنتجت فيها نباتات مقاومة للفيروسات حتى بداية عـام ١٩٩٤ (عن Grumet ١٩٩٥).

المحصول	عدد الحالات المنشورة	الفيروسات
التبغ	٣٧	AlMV, ArMV, CMV, PVX, PVY, TEV, TGMV, TMV, TRV, TSV, TSWV
البطاطس	١٠	PLRV, PVY

تابع جدول (١٤-١٠).

المحصول	عدد الحالات المنشورة	الفيروسات
الطماطم	٥	AlMV, CMV, TMV, TYLCV
الخيار	١	CMV
الكنتالوب	٢	CMV, ZYMV
البرسيم الحجازى	١	AlMV
الباباظ	١	PRSV
الذرة	١	MDMV
الأرز	١	RSV
لفت الزيت	١	TYMV

جدول (١٤-١١): حالات التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات التى أجريت عليها اختبارات حقلية فى الولايات المتحدة، حتى عام ١٩٩٩ (عن Malik ١٩٩٩)

المحصول	الجين	الفيرس
البرسيم الحجازى	Coat protein	Alfalfa mosaic
الشعير	Coat protein	Barley yellow dwarf
البنجر	Coat protein	Beet necrotic yellow vein
الذرة	Coat protein	Maize chlorotic mottle
الذرة	Coat protein	Maize chlorotic dwarf
الذرة	Coat protein	Maize dwarf mosaic
الخيار	Coat protein	Cucumber mosaic
الخيار	Coat protein	Cucumber mosaic, waltermelon mosaic 2, zucchini yellow mosaic
الجلاديولس	Coat protein	Bean yellow mosaic
الخس	Nucleocapsid	Tomato spotted wilt
القاوون	Antisense coat protein	Zucchini yellow mosaic
القاوون	Coat protein	Cucumber mosaic, papaya ringspot, watermelon mosaic2, zucchini yellow
القاوون	Coat protein	Waltermelon mosaic 2, zucchini yellow mosaic
الباباظ	Coat protein	Papaya ringspot

تابع جدول (١٤-١١).

المحصول	الجين	الفيرس
الفول السوداني	Coat protein	Tomato spotted wilt
الفول السوداني	Nucleocapsid	Tomato spotted wilt
البطاطس	Coat protein	Bean yellow mosaic
البطاطس	Antisense coat protein	Potato leaf roll
البطاطس	Coat protein	Potato leaf roll
البطاطس	Coat protein	Potato virus X
البطاطس	Coat protein	Potato virus Y
البطاطس	Antisense coat protein	Potato virus Y
البطاطس	Coat protein	Tobacco vein mottling
البطاطس	Coat protein	Barley yellow dwarf
البطاطس	Coat protein	Tobacco rattle
البطاطس	Antisense coat protein	Tobacco rattle
البطاطس	17 Kda	Barley yellow dwarf
البطاطس	17 Kda	Potato leaf roll
البطاطس	VPg	Potato leaf roll
البطاطس	Replicase	Potato leaf roll
البطاطس	Protease	Potato leaf roll
البطاطس	Coat protein	Tobacco vein mottling
البطاطس	Coat protein	Potato virus X, potato virus Y
البطاطس	Coat protein	Porato Virus X, potato virus Y, potato leaf rool
البطاطس	Coat protein	Potatc virus Y, potato leaf rool
البرقوق	Coat protein	Papaya ringspot
فول الصويا	Coat protein	Soybean mosaic
الكوسة	Coat protein	Papaya ringspot
الكوسة	Coat protein	Cucumber mosaic
الكوسة	Coat protein	Cucumber mosaic, papaya ringspot
الكوسة	Coat protein	Watermelon mosaic 2, zucchini yellow mosaic
الكوسة	Coat protein	Cucumber mosaic papaya ringspot watermelon mosaic2, zucchini yellow mosaic viruses

تابع جدول (١٤-١١).

المحصول	الجين	الفيرس
التبغ	Antisense coat protein	Tobacco etch
التبغ	Coat protein	Tobacco etch
التبغ	Coat protein	Potato virus Y
التبغ	Coat protein	Alfalfa mosaic
التبغ	Coat protein	Beet curly top
التبغ	Coat protein	Tobacco vein mottling
التبغ	Cylindrical inclusion	Tobacco vein mottling
التبغ	Helper component	Tobacco vein mottling
الطماطم	Nucleocapsid	Tomato spotted wilt
الطماطم	CBI	Beet curly top
الطماطم	Coat protein	Tomato yellow leaf curl
الطماطم	Coat protein	Tomato mosaic
الطماطم	Coat protein	Cucumber mosaic
الطماطم	Replicase	Tobacco mosaic
البطيخ	Coat protein	Watermelon mosaic 2, zucchini yellow mosaic

الفصل الخامس عشر

الهندسة الوراثية لمقاومة الحشرات والنيماتودا

لم تحظ جهود الهندسة الوراثية لمقاومة النيماتودا باهتمام الباحثين بالقدر الذى حظيت به جهود إنتاج الأصناف المحولة وراثيًا لمقاومة الحشرات، الأمر الذى ينعكس - بالتالى - على شرحنا لموضوع هذا الفصل، والذى يميل بشدة نحو جهود التحول الوراثى لمقاومة الحشرات.

الاعتماد على جينات المقاومة الطبيعية فى عمليات التحول الوراثى

إن نقل جينات المقاومة للأمراض والآفات من أحد الأنواع النباتية إلى نوع نباتى آخر بطرق الهندسة الوراثية يعد أحد الإنجازات الهامة التى أمكن تحقيقها عن طريق تقنيات الهندسة الوراثية. تتواجد هذه الجينات فى النباتات - عادة فى عناقيد clusters - يطلق عليها اسم R-genes تتضمن عديدًا من الجينات المتماثلة homologus genes، ويدخل ضمنها نسخًا غير نشطة من الجين، وهى التى ربما تمثل مساحات من التباين الوراثى الكامن الذى قد يتحور ليعطى جينات R جديدة تحت ظروف الشد الانتخابى لجينات ضراوة جديدة (avr genes) من قبل المسبب المرضى.

طُرُز المقاومة للحشرات

يعرف طرازان رئيسيان لمقاومة الحشرات فى النباتات يختلفان فى طبيعة المقاومة، كما يلى:

١ - أنتى زينوسس antixenosis .. يُعاق فى تلك الحالة تغذية الحشرات للنبات أو يقل، وذلك - أساسًا - من خلال إحداث تغيرات فى سلوك الحشرة، تعتمد على وسائل فيزيائية أو كيميائية.

تعرف الأنتى زينوسس كذلك باسم عدم التفضيل non-preference، وهى قد تعتمد على صفات فيزيائية فى النبات، مثل سمك الجدر الخلوية، وحدوث تضخمات فى الأنسجة المجروحة، وصلادة السيقان، وتواجد الشعيرات الغدية وكثافتها وأنواعها، والشموع السطحية، وتواجد السليكا بالأنسجة النباتية، وحدوث تحورات تشريحية فى الأعضاء المتخصصة .. إلخ.

وقد تلعب المركبات التى تفرزها النباتات دورًا فى طرد الحشرات أو إحداث تغيرات فى سلوكياتها، مما يؤثر فى تكاثرها وفى مدى الأضرار التى يمكن أن تحدثها. كذلك فإن عدم إفراز النباتات لمركبات معينة جاذبة للحشرات قد يفيد فى حمايتها من الإصابة. هذا .. إلاّ أن بعض المركبات التى تنتجها النباتات قد تلعب دورًا مزدوجًا، كما فى حالة الكيوكربتسينات التى تنتجها القرعيات، والتى تعد بمثابة جاذبات تغذية لخنفساء الخيار المنقطة، ولكنها طاردة للعنكبوت الأحمر (وهو ليس من الحشرات).

٢ - التضادية الحيوية antibiosis: تحدث فى تلك الحالة تغيرات فى تطور الحسرة بعد استعمارها للنبات وبداية تغذيتها عليه.

وغالبًا ما تتضمن التضادية الحيوية تأثيرات كيميائية سامة للحشرات، أو نقص فى تغذيتها. ومن أكثر مجموعات المركبات تأثيرًا كمضادات تغذية، والتى تحدث نقصًا فى النمو الحشرى: التربينويدات terpenoids، والألكالويدات alkaloids، والفلافونات flavonoids، والسيانوجينات الجلوكوسيدية cyanogenic glucosides، والأحماض الأيدروكسامية hydroxamic acids (عن Duck & Evola ١٩٩٧).

أما خاصية التحمل tolerance فهى ليست بمقاومة، إذ إن النباتات المتحملة تتعرض للإصابة الحشرية بالقدر ذاته التى تتعرض له النباتات القابلة للإصابة، ولكن دون أن تتأثر فيها كمية المحصول أو جودته.

استراتيجية التحول الوراثى لمقاومة الحشرات بالاعتماد على جينات المقاومة الطبيعية

تعرف استراتيجية التحول الوراثى لمقاومة الحشرات بواسطة جينات المقاومة التى توجد بصورة طبيعية فى أنواع نباتية أخرى باسم نَسْخ الطبيعة copy nature، وهى تتضمن الخطوات التالية:

١ - البحث عن مصادر المقاومة الحشرية فى الطبيعة.

٢ - تنقية البروتين المسئول عن المقاومة فى كل حالة منها، ودراسة ما إن كان له نظير فى النبات الموديل *Arabidopsis* أم لا.

٣ - إجراء اختبارات السمية على الحشرة باستعمال البروتين النقى.

٤ - إجراء اختبارات السمية على الحيوانات - ومن ثم على الإنسان - باستعمال البروتين النقى.

٥ - التعرف على الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين ونقله بطرق الهندسة الوراثية إلى النوع النباتى المطلوب.

٦ - بعد التأكد من ثبات الصفة المنقولة فى الـ T_1، والـ T_2 (الجيلان الـ transformed الأول والثانى) تجرى الاختبارات البيولوجية على كل من السمية على الحشرة المعنية والحيوانات - ومن ثم على الإنسان - مرة أخرى (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

ويفيد تهريم pyramiding الجينات فى النباتات فى زيادة مقاومتها للأمراض والحشرات، وفى الحد من حالات كسر المقاومة، حيث يؤدى التهريم - بعدة جينات للمقاومة متنوعة التأثير - إلى الحد كثيرًا جدًا - إلى درجة الانعدام - من فرصة ظهور عدة طفرات مناظرة - فى آن واحد - يمكنها كسر كل عوامل المقاومة التى توفرها تلك الجينات، علمًا بأن الطفرة التى تؤدى إلى كسر أحد عوامل المقاومة لا يمكنها البقاء لوجود عوامل المقاومة الأخرى فى النبات.

هذا .. وقد يزيد تهريم جينات المقاومة من شدة المقاومة إما بطريقة تراكمية، وإما بطريقة تداؤبية synergistic (عن Gatehouse ١٩٩٩).

جينات المقاومة الطبيعية للنيماتودا

إن من أهم جينات المقاومة الطبيعية للنيماتودا التى استعملت أو يمكن استعمالها فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة النيماتودا، ما يلى:

١ - الجين $Hs1^{pro-1}$:

كان من أوائل الـ R-genes الفعالة ضد النيماتودا – والتى أمكن عزلها والاستفادة منها عن طريق تقنيات الهندسة الوراثية – الجين $Hs1^{pro-1}$ الذى عُزلَ من النوع *Beta procumbens*، وهو نوع برى من البنجر يكسبه هذا الجين مقاومة للنيماتودا المتحوصلة *Heterodera schachtii*. وقد أدى نقل هذا الجين إلى سلالات بنجر قابلة للإصابة بتلك النيماتودا إلى جعلها مقاومة لها.

٢ - الجين Mi.

كان جين المقاومة الثانى فى الدراسة الـ Mi gene المسئول عن مقاومة الطماطم لكل من *Meloidogyne incognita*، و *M. arenaria*، و *M. javanica*. وقد أوضحت الدراسات تواجد ثلاثة مواقع على دنا الطماطم بها تماثل فى هذا الـ R-gene، تبين أن إحداها كان جينًا كاذبًا pseudogene، بينما كان الآخران جينين محتملين نشطين أعطيا الرمزين Mi 1.1، و Mi 1.2، وتبين أن الثانى (Mi 1.2) هو الذى يكسب النباتات المحولة وراثيًا به المقاومة للنيماتودا. وتبين أيضًا أن هذا الجين يكسب النباتات – كذلك – مقاومة ضد من البطاطس *Macrosiphum euphorbiae*

٣ - الجين Hero

تم عزل الجين Hero من الطماطم، وهو جين يكسب النباتات مستوى واسعًا من المقاومة لنيماتودا البطاطس المتحوصلة، حيث يعطى ٩٥٪ مقاومة ضد *Globodera rostochiensis*، وأكثر من ٨٠٪ ضد *G. pallida*. يقع الجين على الكروموسوم الرابع فى منطقة تحتوى على ١٤ جينًا متماثلاً homologous genes، منها ٨ تبدو كجينات فعالة ونشطة. يتماثل الجين Hero فى نحو ٣٢٪ من الأحماض الأمينية التى يشفر لها مع الجين Mi 1.2، ولكن بنسبة تماثل قدرها ٢١٪ فقط مع الجين Gpa2 (عن Atkinson وآخرين ٢٠٠٣).

٤ – الجين Cre3 لمقاومة النيماتودا *Heterodera avenae* فى القمح

٥ – الجين Gro1 لمقاومة نيماتودا الحوصلات بالبطاطس

٦ – من بين استراتيجيات مقاومة النيماتودا – كذلك – هندسة التعبير الجينى لمركبات سامة للنيماتودا، مثل المركب cystatin – وهو proteinase inhibitor من الأرز – الذى أدى نقل الجين المسئول عن إنتاجه إلى نبات *A. thaliana* إلى إكسابه مقاومة لكل من نيماتودا الحوصلات ونيماتودا تعقد الجذور (عن Bent & Yu ١٩٩٩)

٧ – مثبطات إنزيم البروتييز كمضات للنيماتودا:

تتواجد الأنواع الأربع المعروفة لمثبطات إنزيم البروتييز protease (وهى: الـ cysteine، والـ serine، والـ aspartyl، والـ metallo) فى النباتات، وغالبا ما تتراكم فى أنسجة نباتية معينة استجابة للجروح التى تحدثها آكلات الأعشاب. كذلك تتراكم مثبطات البروتييز فى عديد من البذور، مثل الأرز، والذرة، ودوار الشمس، واللوبيا، ويلعب بعضها دورًا فى التحكم فى الإنبات. وتشكل تلك المثبطات مكونًا طبيعيًا يدخل ضمن غذاء الإنسان، والحيوانات الزراعية، والثدييات الأخرى، والطيور. وتتغلب بعض الثدييات على التأثير الذى تحدثه تلك المثبطات بزيادة إفرازاتها الطبيعية من الإنزيم عند غذائها على علائق غنية بها.

ومن أبرز الأمثلة على مثبطات البروتييز السيرين serine المثبط لإنزيم التربسن trypsin، والذى يتواجد فى بذور اللوبيا (يعطى الرمز CpTI). وجد أن التعبير عن هذا المركب CpTI فى البطاطس المحولة وراثيًا يؤثر فى عملية التكاثر الجنسى للنيماتودا المتطفلة *Globodera pallida* فى بداية الإصابة؛ مما يؤدى إلى سيادة أعداد الذكور الأصغر حجمًا والأقل ضررًا (Atkinson وآخرون ٢٠٠٣)

٨ – يجرى الباحثون محاولات لتحويل النباتات وراثيًا لأجل جعلها أقل صلاحية لتغذية النيماتودا وتطورها داخل جذور النباتات بعد اختراقها لها، كما هو الحال بالنسبة لاستخدام جين التبغ TobRB7 الذى يؤثر – خاصة – على الخلايا العملاقة التى يتحتم تكوينها لاستمرار النمو الطبيعى للنيماتودا (عن Bent & Yu ١٩٩٩).

استراتيجيات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات

إن من أهم الاستراتيجيات التى قامت عليها الهندسة الوراثية للنبات لمقاومة الحشرات، ما يلى.

١ – التعبير عن السم الحشرى δ-endotoxin الخاص بالبكتيريا *Bacillus thuringiensis* فى النباتات (من ذوات الفلقتين وحديثًا ذوات الفلقة الواحدة كذلك) لمقاومة يرقات حرشفية الأجنحة، والتى من أمثلتها دودة ورق القطن، والدودة الخضراء، وديدان اللوز، ودودة ثمار الطماطم، والديدان القياسيه، والدودة الدبوسية، وفراشة درنات البطاطس، وثاقبات الذرة .. إلخ

٢ – التعبير عن مثبطات إنزيم البروتييز protease، مثل الـ trypsin inhibitor، وهى التى تفيد فى مكافحة عديد من اليرقات الحشرية

٣ – التعبير عن بروتينات أخرى، مثل:

أ – اللكتينات lectins وهى التى تتواجد بكثرة فى بذور عديد من النباتات، وتلعب دورًا فى دفاع النباتات ضد الإصابات المرضية والحشرية.

ب – مثبط الألفا أميليز α-amylase inhibitor، وهو الذى يتواجد طبيعيًا فى بذور الفاصوليا، ويلعب دورا فى حمايتها من الإصابة بخنفساء اللوبيا

جـ – إنزيم cholestrol oxidase الذى عزل من الـ *Streptomyces* ووجد له نشاط فعال فى مكافحة ديدان اللوز.

د – بروتينات أخرى عديدة فعالة ضد بعض الحشرات التى تقاوم الـ δ-endotoxin – مثل دودة جذور الذرة والدودة القارضة – وتفرز طبيعيًا بواسطة بعض أنواع البكتيريا، مثل *Bacillus cereus*، و *B. thuringiensis* (عن Koziel وآخرين ١٩٩٨)

لقد أمكن التعرف على عديد من تلك البروتينات ذات الأصل النباتى القاتلة للحشرات (مثل اللكتينات lectins، ومثبطات البروتييز protease inhibitors) التى يمكنها تثبيط نمو وتطور الحشرات عندما تتغذى عليها بكميات كبيرة. كذلك أمكن عزل بعض الجينات التى تشفر لإنتاج عدد من تلك البروتينات، مثل: CpTi، و PIN-I، و PIN-II، و αAI، و GNA، وهى تستعمل فى برامج الهندسة الوراثية، بهدف التربية لمقاومة الحشرات

وقد وجد أن الجينات التى تكسب النباتات مقاومة ضد آفات أخرى غير حشرية تجعلها – كذلك – مقاومة لبعض الحشرات، ومن أمثلة ذلك جين الطماطم Mi-1 الذى يكسبها مقاومة لنيماتودا تعقد الجذور، والذى وجد أنه يكسب النباتات – كذلك – مقاومة لمن البطاطس (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

غربلة مصادر المقاومة

ربما كانت أسرع وسيلة للتوصل إلى نوعيات جديدة من البروتينات ذات التأثير السام على الحشرات – لأجل استخدامها فى عمليات التحول الوراثى للنباتات بهدف مقاومة الحشرات – هى بغربلة أكبر عدد ممكن من البروتينات من أى مصدر كان، كالأنسجة النباتية وإفرازات الكائنات الدقيقة، حيث تضاف العينات البروتينية إما مفردة، وإما فى مجموعات إلى الغذاء الذى تُربى عليه الحشرات الهامة المعنية بالمقاومة. وعندما تُظهر إحدى العينات تأثيرًا سامًا على الحشرة فإنه يتم – بوسائل الفصل المختلفة وإعادة الاختبار – تحديد البروتين المسئول عن هذا التأثير والتأكد من كونه بروتين فى طبيعته، ويلى ذلك عزل الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين واستخدامه فى عمليات التحول الوراثى.

وباتباع هذه الطريقة .. تمكن Corbin وآخرون (١٩٩٨) من التوصل إلى أن البروتين cholesterol oxidase ذات الأصل الميكروبى كان له تأثيرًا سامًا على سوسة اللوز بالقطن cotton boll weevil (*Anthonomus grandis grandis*). ويعتقد الباحثون أن تحويل القطن وراثيًا بالجين المسئول عن إنتاج هذا الإنزيم ربما يلعب دورًا كبيرًا فى مقاومة تلك الآفة.

جينات المقاومة ومصادرها

يعرف حاليًا أكثر من ٤٠ جينًا لمقاومة الحشرات تم نقلها – من مصادر مختلفة – إلى النباتات لأجل إنتاج أصناف مقاومة، ومن بين أهم الجينات التى استخدمت فى هذا المجال، ما يلى

الجين	المصدر الأصلى للجين
Bt	*Bacillus thuringiensis*
isopentyl transferase (ipt)	*Agrobacterium tumefaciens*
cholesterol oxidase	*Streptomyces* spp.
Pht	*Photorhabdus luminescens*

هذا . بالإضافة إلى جينات المقاومة للحشرات التى حُصل عليها من النباتات الراقية، والتى تتحكم فى إنتاج البروتينات التالية

١ – مثبطات البروتينيز proteinase inhibitors.

٢ – مثبطات الأميليز amylase inhibitors.

٣ – اللكتينات lectins، مثل لِكتين زهرة اللبن الثلجية snowdrop lectin، ولكتين البسلة، ولكتين الأرز ... إلخ

كذلك حُصل على جينات المقاومة من أصول حيوانية، مثل مثبطات البروتينيز من السيرين serine proteinase inhibitors، التى حصل عليها من كل الثدييات وحرشفية الأجنحة *Manduca sexta* (وهى الـ tobacco hornworm) (عن Chawla ٢٠٠٠)

وقد اتجه الباحثون – لأجل مكافحة الحشرات بطرق الهندسة الوراثية – إلى محاولة هندسة التعبير عن البروتينات ذات التأثير القاتل للحشرات (insecticidal proteins)، ونشط الباحثون فى البحث عنها فى كل من النباتات وغيرها من الكائنات الحية ومن بين البروتينات ذات التأثير القاتل للحشرات ذات الأصل النباتى التى أمكن رصدها، ما يلى:

polyphenol oxidases	chitinases
trypsin inhibitors	anionic peroxidases
proteinase inhibitors	α-amylase inhibitors
	lectins

ولقد وجد أن الـ chitinases تحلل المكونات الشيتينية بالقناة الهضمية للحشرات وتولد الـ polyphenol oxidases مركبات كيميائية ذات تأثير معتدل السمية على الحشرات من مكونات غذاء الحشرة أما الـ trypsin، والـ α-amylase، والـ

proteinase inhibitors فإنها تتعارض مع الإنزيمات الهاضمة بالحشرة، بينما ترتبط الـ lectins بكل من عديدات التسكر oligosaccharides و الـ glycosylated proteins، بما يتعارض مع عملية الهضم. ولقد أنتجت نباتات محولة وراثيًّا تنتج تلك المركبات وتم اختبارها، إلاّ أن مستوى مقاومة الحشرة – فى كل حالة – لم يبرر إنتاجها تجاريًّا؛ ففى معظم الحالات تتأقلم الحشرة – تدريجيًّا – على الوضع غير المناسب لها فى النبات المحول وراثيًّا (Bent & Yu ١٩٩٩).

ومن بين مركبات الأيض الثانوية التى وجد أنها تلعب دورًا فى مقاومة الحشرات، ما يلى:

١ – الجلوكوسيدات السيانوجينية cyanogenic glucosides، والجلوكوسينولات glucosinolates.

٢ – أحماض الأيدروكسامك الحلقية cyclic hydroxamic acids: تلعب هذه الأحماض دورًا فى دفاع بادرات الذرة والقمح والراى الصغيرة ضد الإصابات البكتيرية والفطرية والحشرية.

٣ – البيرثرين pyrethrin.

٤ – الروتينون rotenone.

٥ – الأميدات غير المشبعة unsaturated amides (عن Chilton ١٩٩٧).

هذا .. ومن المعروف أن إنزيمات البيروكسيديز peroxidases، والليبوكسى جينيز lipoxygenases، والبولى فينول أوكسيديز polyphenol oxidases تلعب دورًا فى مقاومة الحشرات (عن Gatehouse ١٩٩٩).

مثبطات البروتينيز

من المعلوم أن إنزيم البروتينيز proteinase يتواجد فى الجهاز الهضمى للحشرات، وعلى ذلك فإن تواجد مثبطات البروتينيز proteinase inhibitors فى غذاء الحشرة يؤثر فيها سلبيًّا، ويعتقد على نطاق واسع أن وجود تلك المثبطات فى النباتات يوفر لها حماية ضد الحشرات.

تنتشر مثبطات إنزيمات البروتينيز فى المملكة النباتية انتشارًا واسعًا، وتتوفر بكثرة بصفة خاصة – فى البذور وأعضاء التخزين، حيث تتراكم – أحيانا – إلى ما يقرب من ١٪ إلى ١٠٪ من البروتين الكلى بها تتباين تلك البروتينات فى الوزن الجزيئى ما بين ٤٠٠٠ إلى ٨٠٠٠٠، ولكن معظمها يتراوح بين ٨٠٠٠، و ٢٠٠٠٠. ومن أكثر هذه المثبطات انتشارًا تلك التى تعرف باسم السيرين بروتييز serine protease، وهى التى يقع الوزن الجزيئى لمعظمها فى حدود هذا المدى الأخير، حيث يبلغ فى غالبيتها ١٠٠٠٠ (عن Gatchouse ٢٠٠٠)

من أمثلة إنزيمات البروتينيز المعروفة تلك التى تعرف باسم الـ metallo proteinases لكل من. السيرين serine، والسيستين cysteine، والأسبارتك aspartic. تعمل تلك الإنزيمات على إطلاق الأحماض الأمينية من البروتين الموجود بالغذاء، وهى التى تكون حاسمة بالنسبة للنمو والتطور الطبيعيين للحشرة، بينما تعمل مثبطات البروتينيز على حرمان الحشرات من تلك الأحماض الأمينية من خلال تعارضها مع الإنزيمات الهاضمة للحشرة (عن Chawla ٢٠٠٠).

إن مثبطات إنزيمات البروتينيز ذات الأصل النباتي يمكنها تثبيط تلك الإنزيمات فى كل من الحيوانات، والبكتيريا، والفطريات، ولكنها نادرًا ما تؤثر على الإنزيمات المماثلة فى النبات

وتقسم مثبطات البروتييز – عادة – إلى أربع فئات: تلك التى تثبط بصورة خاصة الـ serine proteases، والـ sulphydryl proteases، والـ metallo carboxypeptidases، والـ acid proteases. تقع معظم مثبطات البروتييز النباتية ضمن الفئة الأولى، وهى التى نالت القدر الأكبر من اهتمام الباحثين كذلك نالت الـ sulphydral proteases قدرًا من الاهتمام. وخاصة فيما يتعلق باستخدامها فى مكافحة غمديات الأجنحة.

تثبط الـ serine proteinase inhibitors إنزيمات الـ endopeptidases، مثل التربسن trypsin والكيموتربسن chemotrypsin التى توجد فى كل من النباتات والحيوانات. ولقد أمكن التعرف على ثلاثة طرز تحفز الجروح إنتاجها فى النباتات كوسيلة للدفاع. حيث تؤثر سلبيًا – بشدة – على نمو وبقاء الحشرات، وخاصة من حرشفية الأجنحة

تتميز تلك المثبطات بقدرة كل جزئ منها على تثبيط جزيئين من الإنزيمات. فمثلاً .. يثبط الـ Bowman-Birk inhibitor – المتحصل عليه من فول الصويا – جزئ من التربسن trypsin، وآخر من الكيموتربسن chymotrypsin، ويثبط الـ ragi inhibitor – المتحصل عليه من نبات *Eleusine coracana* – كلا من التربسن، والألفا أميليز α-amylase، وتعرف عدة مثبطات مناظرة للـ Bowman-Birk توجد فى اللوبيا وتثبط إما التربسن فقط، وإما كلا من التربسن والكيموتربسن.

كذلك تعرف عدة مثبطات مستقلة للبروتينيز، منها: الـ cysteine، والـ aspartyl، والـ metallo protease inhibitors. وجميع هذه المثبطات صغيرة فى وزنها الجزيئى، حيث يتراوح بين ٥، و ٢٥ kDa، ويؤدى تواجدها فى غذاء الحشرة إلى زيادة إنتاجها لإنزيم البروتينيز؛ الأمر الذى يؤدى إلى تضخم البنكرياس، ونقص فى وزن جسم الحشرة، ثم موتها (عن Gatehouse ١٩٩٩، و Watt وآخرين ١٩٩٩).

مثبطات البروتينيز التى تستحث الجروح تكوينها

كان أول ما عُزِلَ من مثبطات البروتينيز التى تستحث الجروح تكوينها wound-induced proteinase inhibitors مثبطان أعطيا الرمزان I، و II، عزلا من درنات البطاطس، وذلك فى ستينيات القرن العشرين، وتبين إنتاجهما فى أوراق كل من البطاطس والطماطم استجابة لكل من الإصابات الحشرية والأضرار الميكانيكية. وأظهرت الدراسات إنتاج النباتات جهازيًا لمركب (هو: PIIF) استجابة لإشارة تحدث لدى تعرضها للتجريح، هذا المركب تبدأ منه عملية تمثيل وتراكم مثبطات البروتينيز. وتتباين الأنواع النباتية فى مستوى استجابتها لإنتاج تلك المثبطات من انعدام الاستجابة إلى الاستجابة الشديدة. ولقد تبين أن النباتات التى تتراكم فيها تلك المثبطات استجابة للتجريح لا تكون عائلاً مناسبًا لتكاثر الحشرات، كما فى حالة تغذية يرقات كل من *Heliothis zea*، و *Spodoptera exigua* على البطاطس (عن Watt وآخرين ١٩٩٩).

مثبطات السيستين

أمكن عزل مثبطات الـ cysteine protease من عدة مصادر نباتية، لكن لم تثبت

أهميتها فى مقاومة الحشرات إلاّ بالنسبة لغمديات الأجنحة التى تعتمد علـى cysteine proteases بصورة أساسية فـى هضـمها للـبروتين. ولقـد وجـد أن المثـبط oryzacystatin المتحصل عليه من الأرز يثبط الـ proteases الهاضمة لعـدة أنـواع حشـرية مـن غمـديات الأجنحة.

وتوجد حالات قليلة من النباتات المحولة وراثيًا التـى يعـبر فيهـا عـن مثبطـات الـ cysteine protease، ومنها: الحور، والتبغ، والأرز. وفى الأرز اختبر تأثير المثـبط علـى المقاومـة للنيمـاتودا، حيـث لـوحظ إحداثـه لـنقص قـدره ٥٥٪ فـى إنتـاج البـيض (عـن Gatehouse ١٩٩٩، و Watt ١٩٩٩).

مثبطات السيرين

تحتوى كل من البطاطس والطماطم على مثبطين قويين للـ serine proteases يأخـذان الاسـمين Inhibitor I، و Inhibitor II. يحتوى Inhibitor I على موقـع تفـاعلى واحـد، وهو يثبط الكيموتربسـن، ولا يثبط التربسـن إلا قـليلاً. بينما يحتوى الـ Inhibitor II علـى موقعين تفاعليين، يُثَبَّط التربسن بواسطة أحـدهما، والكيموتربسـن بواســطة الآخـر. يـتم تمثيل المثبطين كبادئين لمركبات أخرى تخزن فى الفجوات العصارية. وتجدر الإشارة إلى أن هذين المثبطين يُستحث إنتاجهما فى أوراق البطاطس والطمـاطم اسـتجابة للتجـريح، على الرغم من أنهما يتراكمان فى درنات البطاطس.

ونظرًا لأن الـ serine proteases (التربسن والكيموتربسن) مما أهم الـ endoproteases الهاضمة فى معى الحشرات، فإن تلك المثبطات يمكـن أن يكـون لهـا أهميـة كـبيرة فـى الحماية من الحشرات، وخاصة حرشفيات الأجنحة (عن Gatehouse ١٩٩٩).

مثبطات بروَمان/برك (مثبطات التربسن والكيموتربسن)

تم عزل أول مثبطات البروتينيز من الطـراز المعـروف باسـم بروَمـان/بـرك Browman-Birk proteinase inhibitor من فول الصويا، وتلاه عزل عديد من المثبطات الأخـرى مـن الطراز ذاته من بعض أنواع العائلة البقولية كاللوبيا، وجميعهـا ذات وزن جزيئـى صـغير

(حوالى ٨ kDa)، وغنية فى السيستين cysteine، وتتكون أساسًا فى البذور أثناء تكوينها. ولهذه المثبطات موقعين نشطين لنوعين من إنزيمات البروتينيز، هما: التربسن trypsin، والكيموتربسن chemotrypsin.

ولقد كان أحد تلك المثبطات، وهو الـ cowpea trypsin inhibitor (اختصارًا: CpTI) أول ما استخدم – من بين مختلف مثبطات البروتينيز – فى دراسات الهندسة الوراثية، وذلك فى محاولة لمكافحة سوسة بذور اللوبيا *Callosobruchus maculatus* (عن Watt وآخرين ١٩٩٩).

يُعطى هذا الجين الرمز CpTI، وهو أكثر المثبطات المعروفة تأثيرًا. ينتج هذا الجين مركبات مضادة للأيض antimetabolite substances توفر حماية للوبيا ضد أهم خنافس البذور، وهى الـ Bruchid beetle (*Callosobruchus maculatus*). كذلك يعتبر هذا الجين ضارًا بحشرات متباينة كثيرًا (جدول ١٥-١) مثل: *Heliothis virescens*، و *Manduca sexta* (وهما من حرشفيات الأجنحة Lepidopteran)، وكلا من *Callosobruchus*، و *Anathomus grandis* (وهما من غمديات الأجنحة Coleopteran)، و *Locusta migratoria* (وهو مستقيم الأجنحة Orthopteran)، ولكنه ليس ضارًا بالثدييات (عن King ١٩٩٠، و Chawla ٢٠٠٠).

ولقد أمكن عزل الجين CpTI واستعمل عن طريق فيرس موزايك القنبيط فى تحويل التبغ وراثيًا، مما أدى إلى اكتسابه مقاومة واضحة لدودة لوز القطن *Helicoverpa* zea، مقارنة بنباتات الكنترول غير المحولة وراثيًا (عن Chawla ٢٠٠٠).

هذا .. إلاّ أنه على الرغم من أن النباتات التى عُدِّلت وراثيًا بجين اللوبيا CpTI احتوت على البروتين المثبط للتربسن بكميات وصلت إلى نحو ١٪ من البروتين الكلى الذائب، وعلى الرغم من أن الحماية التى وفرها هذا البروتين ضد حشرات مثل *Heliothis zea*، و *Spodoptera littoralis* كانت معنوية، إلاّ أنها لم تصل إلى المستوى المناسب للمكافحة الجيدة التى يرضى عنها المزارعون (عن Gatehouse ١٩٩١).

جدول (١٥-١): الحشرات التي تؤثر فيها مثبطات التربسن المتحصل عليها من اللوبيا والتي يشفر لإنتاجها الجين CpTI (عن Gatehouse وآخرين ١٩٩٢).

الرتبة	الحشرة	المحاصيل الرئيسية التي تصاب بالحشرة
حشرات حقلية		
Lepidoptera	*Heliothis virescens*	التبغ والقطن
	Heliothis zea	الذرة والقطن والفاصوليا والتبغ
	Helicoverpa armigera	القطن والفاصوليا والذرة والسورجم
	Spodoptera littoralis	الذرة والأرز والقطن والتبغ
	Chilo partellus	الذرة والسورجم وبنجر السكر والأرز
	Autographa gamma	بنجر السكر والخس والكرنب والفاصوليا والبطاطس
	Manduca sexta	الطماطم والتبغ والبطاطس
Orthoptera	*Locusta migratoria*	النجيليات
Coleoptera	*Diabrotica undecimpunctata*	الذرة
	Costelytra zealaadica	المجيليات والبرسيم
	Anthonomus grandis	القطن
حشرات المخازن		
Coleoptera	*Callosobruchus maculatus*	اللوبيا وفول الصويا
	Tribolium confusum	معظم الزهور

وقد أمكن تحويل القنبيط وراثيًّا بجين مثبط للتربسن حُصِلَ عليه من إحدى سلالات البطاطا المقاومة لعدد من الحشرات المحلية الانتشار في تايوان، الأمر الذى ظهر كذلك في نباتات القنبيط التي حولت وراثيًّا (Ding وآخرون ١٩٩٨).

كذلك وجد أن كلا من الـ anti-trypsin، والـ anti-chemotrypsin، والـ anti-elastrase الحشرية أدت - عند التعبير عنها في التبغ - إلى نقص تكاثر الحشرات التي تغذت عليها بنسبة ٩٨٪، مقارنة بالكنترول (عن Watt ١٩٩٩).

هذا ويعطى جدول (١٥-٢) قائمة بعدد من الأنواع المحصولية التي حولت وراثيًّا بجينات مختلفة من مثبطات البروتينيز، والأنواع الحشرية التي قاومتها تلك الأنواع المحصولية

جدول (١٥-٢): جينات مضادات البروتينيز التى استخدمت فى هندسة بعض الأنواع المحصولية وراثيًا لمقاومة بعض الأنواع الحشرية (عن Gatehouse ١٩٩٩).

النوع المحصولى المحول وراثيًا	الجينات	الحشرات التى تمت مقاومتها
التبغ	CpTI	*Heliothis* virescens
	Pot PI II	Lepidoptera
	CpTI + p-lec	*Heliothis* virescens
	Na PI	*Helicoverpa* punctigera
البطاطس	CpTI	*Lacanobia* oleracea
الطماطم	Pot PI I	*Helicoverpa* armigera
		Teleogryllus commodus
	Pot PI II	*Helicoverpa* armigera
		Teleogryllus commodus
	CpTI	
الأرز	Pot PI II	*Sesamia* inferens
		Chilo suppressalis
	CpTI	*Sesamia* inferens
		Chilo suppressalis
الفراولة	CpTI	*Otiorhynchus* sulcatus
الخس	CpTI	
	Pot PI II	*Teleogryllus* commodus
البطاطا	CpTI	
لفت الزيت	CpTI	
	OC-I	Coleoptera
	CII	Lepidoptera
		Diptera
القطن	M. S PI	*Bemisia* tabaci
البرسيم الحجازى	M. S PI	Thrips
التفاح	CpTI	*Cydia* pomenella
الحور	OC-1	*Chrysomela* tremulae
	CII	Lepidoptera
البتولا Birch	Pot PI II	

CpTI = cowpea trypsin inhibitor; CII = double headed serine protease inhibitor from soybean; Na PI = *Nicotiana alata* protease inhibitor; OC-1 = oryzacystatin; Pot PI II = Potato proteinase inhibitor II; Pot PI I = Potato proteinase inhibitor I; p-lec = pea lectin.

مثبطات الأميليز

اكتشفت مثبطات الألفا الأميليز α-amylase inhibitors فى عدد من الحبوب النجيلية، ووجد أن لبعضها وظيفة مزدوجة، حيث أظهرت - كذلك - نشاطًا مضادًا للتربسن. هذا .. وبحصول الحشرات على مثبطات الألفا أميليز ضمن غذائها، فإن ذلك يتعارض مع نشاط إنزيمات الألفا أميليز بها؛ بما يخل بعملية تحلل النشا (عن Watt 1999).

ومن المعلوم أن بذور الفاصوليا تتميز بمقاومتها للسوس، مثل سوسة اللوبيا *Callosobruchus maculatus*، وسوسة فاصوليا أدزوكى *C. chinensis*، الأمر الذى يرجع إلى احتواء البذور على ذلك البروتين α-AI-Pv، المثبط لإنزيم الألفا أميليز، والذى يعد سامًا ليرقات تلك الحشرات.

ولقد أمكن تحويل البسلة وراثيًا بالجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين باستخدام promoter خاص بالبذور، حيث كان التعبير عنه فى بذور البسلة بالدرجة ذاتها التى يُعبّرُ بها عنه فى بذور الفاصوليا، كما كانت بذور البسلة المحولة وراثيًا مقاومة - مثل الفاصوليا - لكلا النوعين من الحشرات (Shade وآخرون 1994).

وقد أدى تحويل فاصوليا أدزوكى adzuki bean (وهى *Vigna angularis*) وراثيًا بجين الفاصوليا - الذى يشفر لتمثيل مثبط إنزيم الألفا أميليز α-amylase inhibitor - إلى جعلها مقاومة كليًا - مثل الفاصوليا - لكل من سوستى البذور *Callosobruchus chinensis*، و *C. analis*، ولكنها - ومثل الفاصوليا كذلك - لم تكن مقاومة للسوسة *Zabrotes subfaciatus*. هذا .. مع العلم بأن إنزيم الألفا أميليز يوقَف نشاطه فى معى السوستين *C. chinensis*، و *C. analis* بفعل مثبط الإنزيم (Ishimoto وآخرون 1996).

كذلك أمكن التعبير عن ثلاثة جينات لمثبطات الألفا أميليز فى التبغ، حيث أظهرت نشاطًا مضادًا لحشرات غمدية الأجنحة. كما أظهرت البسلة المحولة وراثيًا بجين مثبط الألفا أميليز من الفاصوليا .. أظهرت مقاومة لسوسة البسلة (عن Watt وآخرين 1999).

اللكتينات النباتية

إن اللكتينات lectins عبارة عن بروتينات ذات تركيب خاص، تتواجد في الطبيعة في كل من النباتات، والحيوانات، والحشرات، والكائنات الدقيقة، ويعتقد بأن من وظائفها في النباتات حمايتها من الإصابات الحشرية، حيث ترتبط بالسكريات وتؤثر على أيض المواد الكربوهيدراتية في عديد من الأنواع الحشرية. وتعرف أنواع عديدة من اللكتينات (جدول ١٥-٣)، ومن أكثرها انتشارًا تلك التي تتراكم في بذور البقوليات، والتي قد يصل تركيزها إلى حوالي ٣٪، كما في بذور الفاصوليا

ولقد عرفت سمية تلك المركبات للثدييات والطيور منذ فترة طويلة. كذلك وجد أن تلك اللكتينات ترتبط بالخلايا المبطنة لمعي الديدان الحشرية، مما يؤثر فيها، ويعطل عملها، ويزيد من فرصة مرور المركبات الضارة للحشرة من خلالها (عن Gatehouse وآخرين ١٩٩٢).

ولقد أظهرت اللكتينات المتخصصة على المانُوز mannose-specific lectins خصائص مثبطة قوية ضد الحشرات الثاقبة الماصة، مثل المن، والذبابة البيضاء، ونطاطات النباتات، ونطاطات الأوراق، وأمكن عزل تلك المثبطات من نباتات مختلفة، مثل نبات زهرة اللبن الثلجية snowdrop، والنرجس البرى daffodil (وهو *Narcissus pseudonarcissus*)، والثوم (عن Watt وآخرين ١٩٩٩)

ولعل أهم اللكتينات المعروفة تلك التي عزلت من نبات زهرة اللبن الثلجية snowdrop (الذى يعرف بالاسم العلمي: *Galanthus nivalis*)، وهي التي نالت حظًا وافرًا من اهتمام الباحثين بسبب نشاطها المضاد للمن ولقد أمكن نقل هذا الجين بطرق الهندسة الوراثية لكل من البطاطس، ولفت الزيت، والطماطم وأظهرت الدراسات على البطاطس المحولة وراثيًا والتي عُبِّر فيها عن هذا الجين أنه لا يزيد من معدل موت الحشرات، ولكنه يقلل كثيرًا من خصوبتها وتكاثرها ومن أهم خصائص هذا الجين أنه يؤثر - كذلك - على مختلف الحشرات الثاقبة الماصة الأخرى، ولكن من أهم عيوبه أن لا يكون فعّالاً إلا عندما تتناول الحشرة البروتين الخاص بهذا الجين بكميات كبيرة (عن Chawla ٢٠٠٠)

جدول (١٥-٣): أهم اللكتينات النباتية ذات التأثير القاتل على الحشرات inceticidal plant lectins (عن Gatehouse ١٩٩٩).

السكر الذى يتخصص عليه اللكتين	اللكتين	الحشرة	الرتبة الحشرية
GalNAc	Castor bean	*Ostrinia nubilalis*	Lepidoptera
GalNAc	Camel's foot tree		
GalNAc	Wheatgerm (WGA)		
Mannose	Snowdrop (GNA)	*Lacanobia oleracea*	
Complex carbohydrates	Bean (PHA)	*Callosobruchus*	Coleoptera
GlcNAc	Winged bean	*maculatus*	
GlcNAc	Griffonia		
GalNAc & GlcNAc	Various sources		
GlcNAc	Rice		
GlcNAc	Stinging nettle (UDA)		
Mannose	Snowdrop (GNA)		
2,6-neuraminyl-gal/GalNAc	Elderberry (SNA-1)		
--	Bean (Arcelin)	*Zabrotes subfaciatus*	
GalNAc & GlcNAc	Various sources	*Diabrotica*	
Mannose	Snowdrop (GNA)	*undecimpunctata*	
Mannose	Snowdrop (GNA)	*Nilaparvata lugens*	Homoptera
GlcNAc	Wheatgerm (WGA)		
Glucose/Mannose	Jackbean (Con A)	*Acyrthosiphon pisum*	
Mannose	Snowdrop (GNA)	*Myzus persica*	
Mannose	Snowdrop (GNA)	*Aulacorthum solani*	
GalNAc & GlcNAc	Various sources	*Empoasca fabae*	
GlcNAc	Wheatgerm (WGA)	*Lucilia cuprina*	Diptera
Glucose/Mannose	Jackbean (Con A)		

ويبين جدول (١٥-٤). الأنواع المحصولية التى تم تحويلها وراثيًا لمقاومة الحشرات بواسطة جينات اللكتينات أو جينات المركبات الشبيهة باللكتينات.

جدول (١٥-٤): الأنواع المحصولية التى حولت وراثيًا بجينات اللكتينات أو بجينات المركبات الشبيهة باللكتينات lectin-like genes.

النوع المحصولى	الجينات	الحشرات التى تمت مقاومتها
التبغ	GNA	*Heliothis virescens*
		Myzus persicae
	p-lec	*Heliothis virescens*
	CpTI + p-lec	
البطاطس	GNA	*Lacanobia oleracea*
		Myzus persicae
		Aulacorthum solani
	GNA + BCH	*Myzus persicae*
		Aulacorthum solani
الطماطم	GNA	*Lacanobia oleracea*
الأرز	GNA	*Nilaparvata lugens*
البطاطا	GNA	
لفت الزيت	GNA	
البسلة	a-AI	*Zabrotes subfaciatus*
		Bruchus pisorum
فاصوليا أدزوكى	a-AI	*Callosobruchus chinensis*

GNA = snowdrop lectin; p-lec = pea lectin; CpTI + p-lec = cowpea trypsin inhibitor + pea lectin; GNA + BCH = snowdrop lectin + bean chitinase; a-AI = bean α-amylase inhibitor.

وربما أمكن كذلك الاستفادة من الجين المسئول عن تمثيل البروتين أجلوتينين agglutinin، الذى يصنع فى جنين حبة القمح، والذى يعد من اللكتينات lectins المقيدة والرابطة للشيتين chitin-binding، ويعرف بتثبيطه لنمو يرقات الحشرات التى تتغذى على الأغذية المجهزة المزودة بهذا البروتين. فإذا أمكن نقل هذا الجين إلى الذرة - مثلاً - وعُبِّرَ عنه بقدر كافٍ فإنه قد يجعل النبات مقاومًا لعديد من الحشرات. لكن بالنظر إلى أن هذا البروتين يمنع بعض العمليات الحيوية فى خلايا الإنسان - كذلك - فإنه يتعين ألا يزيد حد التعبير عنه فى النباتات المحولة وراثيًا عن ذلك الذى يتحمله الإنسان (كالمستوى الموجود فى القمح)، أو أن يرافق الجين بآخر ينظم التعبير عنه فى

الأجزاء النباتية التى لا يستعملها الإنسان فى غذائه (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

إن من أهم العوامل المسببة للقلق بشأن استخدام اللكتينات فى عمليات التحول الوراثى هى خصائصها المضارة للتغذية فى أغذية الإنسان والحيوان، وتأثيراتها على الحشرات النافعة غير المستهدفة بها. فعلى سبيل المثال . أظهرت لكتينات الفاصوليا وفول الصويا تأثيرات سامة مضادة للتغذية على معظم الحيوانات. كذلك من مشاكل الاعتماد على اللكتينات الحاجة إلى تركيزات عالية منها لكى تُحدث تأثيرها السام على الحشرات (عن Czapla ١٩٩٧)

إنزيمات الشيتينيز

يدخل الشيتين chitin [وهو البوليمر غير المتفرع للـ 2-acetamide-2-deoxy-D-glucopyranoside (أو N-acetylglucosamine، واختصارًا GlcNAc)] برابطة β-1,4 يدخل هذا الشيتين كمكون أساسى فى تركيب الأديم cuticle والغلاف القشرى shells للحشرات، وفى تركيب الجدر الخلوية للفطريات وبعض الطحالب، كما يتواجد فى كل من النيماتودا والرخويات mollusks، وأنواع عديدة من الكائنات

ونظرًا للأهمية الكبرى للسيتين والإنزيمات الشيتونيلية chitinolytic enzymes فى نمو الحشرات وتطورها، فإن تلك الإنزيمات تحظى بقدر كبير من اهتمام الباحثين فيما يتعلق باستعمالها ذاتها كمبيدات حشرية حيوية، أو بروتينات دفاعية فى النباتات، التى تحول وراثيًا لهذا الغرض، أو الاعتماد عليها فى كائنات حية دقيقة محولة وراثيًا بها؛ لتستخدم فى المكافحة الحيوية للحشرات

وتُعرّف إنزيمات الشيتينيز chitinases بأنها إنزيمات ذات نشاط موجه لتحلل بوليمر الشيتين، هذا إلاّ أن بعض إنزيمات الشيتنيز تحلل بوليمرات أخرى قريبة، مثل متعددة السكريات التى توجد فى الجدر الخلوية والتى تحتوى على N-acetylglucosamines، و N-acetylmuramates التى يكون فيها الارتباط برابطة β,1-4 يحدث التحلل الإنزيمى عشوائيًا فى مواقع داخلية على امتداد طول جزئ

الشيتين، ويكون المنتج النهائى لعملية التحلل كتل جزيئية قابلة للذوبان فى الماء من الـ GlcNAc، مثل chitotetraose، والـ chitotriose، والـ chitobiose، وجميعها مركبات عديدة التسكر تعد بمثابة مواد يعمل عليها إنزيم شيتونيلى آخر، هو β-N-acetylglucosaminidase الذى يقوم بفصل وحدات الـ GlcNAc عن النهاية غير المختزلة. ولقد وجد كلا النوعين من الإنزيمات فى عدد من الكائنات متضمنة كائنات تحتوى على الشيتين، مثل الحشرات، والقشريات crustaceans، والخمائر، والفطريات، وكذلك فى كائنات لا تحتوى على شيتين، مثل البكتيريا والنباتات الراقية والفقاريات.

تلعب إنزيمات الشيتينيز – فى الحشرات – دورًا فى كل من الانسلاخ والهضم، فالحشرات تقوم دوريًّا بطرح أديمها القديم وتمثيل آخر جديد، وتتم تلك العملية بمساعدة إنزيمات الشيتنيز التى تتواجد فى سائل الانسلاخ الذى يتراكم فى المسافة التى تفصل بين الأديم القديم وطبقة البشرة هذا .. ويعاد استخدام نواتج تحلل الأديم القديم فى تمثيل الجديد، حيث غالبًا ما تقوم الحشرة بتناول تلك النواتج ضمن غذائها، ويبدو أن إنزيمات الشيتينيز التى توجد فى معى اليرقة تلعب دورًا هاضمًا، بالإضافة إلى دورها فى تحليل الشيتين الذى يتواجد فى بطانة المعى.

أما فى الفطريات .. فإن إنزيمات الشيتينيز تساعد فى تحليل المادة العضوية، وربما تفيد فى الحد من نمو الفطريات الأخرى. وفى الخمائر تفيد إنزيمات الشيتينيز فى فصل الخلايا عن بعضها البعض.

إن الدور الذى تلعبه إنزيمات الشيتينيز النباتية معروف جيدًا، ولقد أمكن عزل عديد من إنزيمات الشيتينيز النباتية والميكروبية، ونقل بعضها إلى النباتات، حيث أدت إلى زيادة مقاومتها للأمراض الفطرية. هذا .. إلاّ أن الدور الذى تلعبه مختلف الإنزيمات الشيتينية فى مقاومة الحشرات لم يمكن فهمه جيدًا بعد

ولقد استعملت الإنزيمات الشيتينية البكتيرية فى تحفيز نشاط المبيدات الحشرية الميكروبية، بما فى ذلك *Bacillus thuringiensis*.

ويبدو أن إنزيمات الشيتينيز تلعب دورا فى اختراق الفطريات المرضة لأديم العائل.

وتُفْرز إنزيمات الشيتينيز، والـ β-N-acetylglucosaminidases عندما تنمو الفطريات المرضة للحشرات: *M. anisopliae*، و *B. bassiana*، و *Verticilium lecanii* على أديم الحشرات.

ولا نعرف أى استعمال للإنزيمات الشيتينية النباتية فى مكافحة الحشرات، علما بأن نباتات الحبوب النجيلية تحتوى على مستويات عالية من الإنزيمات الشيتينية (١٥–١٠٠ ميكروجرام/جم)، ومع ذلك فإن الحبوب المخزنة تكون قابلة للإصابة بالحشرات.

ولقد أمكن عزل الجين المسئول عن تكوين جين الشيتينيز من الحشرة *M. sexta*، ونقل بطرق الهندسة الوراثية إلى كل من التبغ والطماطم، وعندما ربيت يرقات *Heliothis virescens* على أوراقها لمدة ثلاثة أسابيع كان نموها يقل بمقدار ٨٠٪ عن نمو اليرقات التى ربيت على أوراق نباتات عادية غير معدلة وراثيًّا (عن Kramer وآخرين ١٩٩٧).

الجمع بين الجينات ذات المصادر النباتية والمقارنة بينها

أدى تحويل البطاطس وراثيًا بالجينين المسئولين عن إنتاج مثبط ألفا أميليز القمح wheat α-amylase inhibitor، ولكتين زهرة اللبن الثلجية snowdrop lectin معًا، أو بالجينين المسئولين عن إنتاج شيتينيز الفاصوليا bean chitinase ولكتين زهرة اللبن الثلجية معًا .. أدى ذلك إلى جعل نباتات البطاطس مقاومة للمن بصورة جوهرية (Gatehouse وآخرون ١٩٩٦).

كما قارن Gatehouse وآخرون (١٩٩٧) تأثير ثلاثة جينات ذات أصول نباتية – هى التى تشفر لكل من: لكتين lectin زهرة اللبن الثلجية snowdrop (وهى *Galanthus nivalis*) أو GNA، وإنزيم شيتينيز chitinase الفاصوليا أو BCH، وإنزيم ألفا أميليز α-amylase القمح أو WAI – قارنها مع تأثير جين اللوبيا المثبط لفعل التربسين trypsin inhibitor (CpTI) على حشرة فراشة الطماطم *Lacanobia oleracea*، حيث قاموا بإنتاج نباتات بطاطس محولة وراثيًا بأى من تلك الجينات منفردة أو فى أزواج.

وجد الباحثون أن جميع النباتات المحولة وراثيًا عبرت عن بروتينات الجينات التى نقلت إليها باستثناء تلك التى حولت وراثيًا بالـ WAI، وكان تركيز البروتينات الخاصة بمختلف الجينات أعلى فى النباتات التى حولت وراثيًا بالجينات المفردة عما فى تلك التى حولت وراثيًا بأزواج من الجينات. وقد أظهرت جميع النباتات التى عُبِّر فيها عن الـ GNA مستوى عاليًا من المقاومة لحشرة فراشة الطماطم، حيث انخفض الضرر بالأوراق عن ٥٠٪، مقارنة بالضرر الذى حدث بنباتات المقارنة. وبالمقارنة .. لم يكن للتعبير عن BCH أى تأثير على تلك الحشرة. أما تأثير CpTI فكان مماثلاً لتأثير GNA على بقاء الحشرة وتكاثرها، ولكنه لم يوفر حماية من الضرر الحشرى على النبات.

هذا .. ويعطى جدول (١٥-٥) قائمة بعديد من الجينات ذات الأصل النباتى التى استعملت فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات.

مصادر أخرى لجينات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات

من بين المصادر الأخرى لجينات التحول الوراثى التى استخدمت فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات بخلاف تلك التى أسلفنا بيانها (النباتات الراقية)، وتلك التى نختم بها هذا الفصل (البكتيريا *Bacillus thuringiensis*)، ما يلى:

١ - البروتين (الإنزيم) cholestrol oxidase:

أظهر البروتين cholestrol oxidase المتحصل عليه من راشح مزارع الـ *Streptomyces* سمية عالية ليرقات الـ boll weevil، ولقد أمكن نقل الجين المسئول عن إنتاج هذا الإنزيم إلى التبغ.

٢ - الجين ipt:

إن الجين ipt هو المسئول عن إنتاج الإنزيم isopentenyl transferase - الذى يوجد فى البكتيريا *Agrobacterium tumefacines*، والذى يعد إنزيمًا رئيسيًا فى مسار تمثيل السيتوكينين. ولقد أدى تحويل التبغ والطماطم وراثيًا بهذا الجين إلى ضعف تغذية يرقات الـ tobacco hornworm على أوراقهما، وكذلك ضعف معيشة وبقاء من الخوخ الأخضر *Myzus persicae* عليهما.

جدول (١٥-٥): الجينات ذات الأصل النباتى التى استخدمت فى مقاومة الحشرات (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

الجين النباتى	البروتين الذى يشفر له الجين	مصدر الجين	الحشرات التى يؤثر فيها	النباتات التى حولت وراثيًا
Protease inhibitors	*Inhibited protease*			
C-II	Serine protease	فول الصويا	Coleoptera, Lepidoptera	لفت الزيت والحور والبطاطس والتبغ
CMe	Trypsin	الشعير	Lepidoptera	التبغ
CMTI	Trypsin	الكوسة	Lepidoptera	التبغ
CpTI	Trypsin	اللوبيا	Coleoptera, Lepidoptera	التفاح والخس ولفت الزيت، والبطاطس والأرز والفراولة ودوار الشمس والبطاطا والتبغ والطماطم والقمح
14K-CI	Bifunctional serine Protease and α-amylase	الحبوب		التبغ
MTI-2	Serine protease	المسترد	Lepidoptera	الـ Arabidopsis والتبغ
OC-1	Cysteine protease	الأرز	Coleoptera, Homoptera	لفت الزيت والحور والتبغ
PI-IV	Serine protease	فول الصويا	Lepidoptera	البطاطس والتبغ
Pot PI-I	Proteinase	البطاطس	Lepidoptera, Orthoptera	البيتونيا والتبغ
Pot PI-II	Proteinase	البطاطس	Lepidoptera, Orthoptera	البتولا والخس والأرز والتبغ
KTi3, SKTI	Kunitz trypsin	فول الصويا	Lepidoptera	البطاطس والتبغ والأرز
PI-I	Proteinase	الطماطم	Lepidoptera	البرسيم الحجازى والتبغ والطماطم
PI-II	Proteinase	الطماطم	Lepidoptera	التبغ والطماطم

تابع جدول (١٥-٥):

الجين النباتى	البروتين الذى يشفر له الجين	مصدر الجين	الحشرات الى يؤثر فيها	النباتات الى حولت وراثيًا
α-Amylase inhibitors				
a-AI-Pv	α-amylase	الفاصوليا	Coleoptera	فاصوليا أدزوكى والبسلة والتبغ
WMAI-I	α-amylase	الحبوب	Lepidoptera	التبغ
14-K-CI	Bifunctional Serine protease and α-amylase	الحبوب		التبغ
Lectins				
GNA	Lectin	زهرة اللبن الثلجية	Homoptera, Lepidoptera	العنب ولفت الزيت والبطاطس و الأرز والبطاطا وقصب السكر ودوار الشمس والتبغ
p-lec	Lectin	البسلة	Homoptera, Lepidoptera	البطاطس والتبغ
WGA	Agglutinin	جنين القمح	Lepidoptera, Coleoptera	الذرة
Jacalin	Lectin	Jack fruit	Lepidoptera, Coleoptera	الذرة
Rice lectin	Lectin	الأرز	Lepidoptera, Coleoptera	الذرة
Others				
BCH	Chitinase	الفاصوليا	Homoptera, Lepidoptera	البطاطس
Peroxidase	Anionic peroxidase	التبغ	Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera	الصمغ والتبغ والطماطم
Chitinase	Chitinase			لفت الزيت
TDC	Tryptophan decarboxylase	*Catharanthus roseus*	Homoptera	التبغ

٣ – جينات من الثدييات

من بين بروتينات الثدييات التي أظهرت نشاطًا كبيرًا في مقاومة الحشرات كلاً من: الـ bovine pancreatic trypsin inhibitor، و α-antitripsin، و spleen inhibitor، ولقد أمكن نقل الجينات التي تتحكم في إنتاج تلك البروتينات إلى عدد من النباتات، إلاّ أن النتائج الأولية (مع فراشة درنات البطاطس على البطاطس) لم تكن مشجعة.

٤ – جينات من الحشرات

أدت جينات مثبطات البروتينيز المتحصل عليها من *Manduca sexta* مثل الـ anti-chemotrypsin، والـ anti-elastrase، التي عبر عنها في القطن، وكذلك أدى إنزيم الـ chitinase الذي عبر عنه في التبغ إلى خفض تكاثر كلا من الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci*، و *Heliothis virescens*، على التوالي (عن Chawla ٢٠٠٠).

البروتينات البللورية للبكتيريا باسيلس ثورنجينسس

لقد عرف منذ نحو ٦٠ عامًا أن البروتينات البلّورية crystal proteins التي تنتجها البكتيريا *Bacillus thuringiensis* لها تأثيرات سامة على الحشرات، واستخدمت التحضيرات التجارية لتلك البكتيريا – بالفعل – في مكافحة أكثر من ٥٠ نوعًا من حرشفيات الأجنحة هذا . إلاّ أن الاهتمام الحقيقي بها لم يبدأ إلاّ في عام ١٩٨٥ بعد عزل الجين الخاص بأحد تلك البروتينات، ثم نقله إلى الطماطم بواسطة Fischhoff وآخرون في عام ١٩٨٧، بهدف مقاومة يرقات حرشفيات الأجنحة في ذلك المحصول (عن King ١٩٩٠)

وقد أعقب ذلك اكتشاف هذا البروتين ذاته في عديد من سلالات هذه البكتيريا وتدريجيًا بدا واضحًا أن السلالة البكتيرية الواحدة يمكنها إنتاج عددا من تلك البروتينات كذلك أمكن التوصل إلى عدد من سلالات البكتيريا *B. thuringiensis* التي تفيد – مجتمعة – في مكافحة مدى واسعًا من حرشفيات الأجنحة. كما أمكن التوصل إلى عدد قليل من السلالات ذات النشاط المضاد لغمديات الأجنحة (عن Hilder ١٩٩٠)

وباختصار .. فإن البكتيريا *B. thuringiensis* تقوم بتمثيل بروتين متبلور قاتل للحشرات. يذوب هذا البروتين فى الظروف القلوية للمعى الوسطى midgut ليرقات حرشفية الأجنحة بعد حصولها عليه ضمن غذائها، ثم يهضم هذا البروتين بواسطة إنزيمات الـ proteases بالمعى الأوسط؛ لينتج منه بولى بيبتيد polypeptide تكون مقاومة لمزيد من الهضم بفعل الـ peptidase، وتكون فى الوقت ذاته سامة للحشرة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

أنواع السموم وطبيعة سميتها للحشرات

تعد *Bacillus thuringiensis* من بكتيريا التربة القادرة على تكوين الجراثيم، وهى تنتج نوعين – على الأقل – من البروتينات السامة للحشرات والنيماتودا، كما يلى:

١ – سموم خارجية exotoxins:

تنتج هذه السموم بواسطة الجين vip3a فى مراحل النمو غير الجنسى، وهى تنطلق للتربة. وتعد الـ β-exotoxins سامة للنيماتودا.

٢ – سموم داخلية δ-endotoxins:

تنتج هذه السموم بواسطة مجموعة جينات الـ cry، خلال مرحلة التجرثم البكتيرى، حيث تكوِّن البكتيريا بلّورات بروتينية تبقى داخل الجرثومة. وعندما تحصل الحشرة على هذا السم ضمن غذائها فإنه يرتبط بمواقع خاصة فى الخلايا المبطنة للمعى. وقد أمكن التعرف على جينين من الـ cry2 يتخصص السم الذى يفرزه أحدهما على حرشفية الأجنحة Lepidoptera والآخر على ثنائية الأجنحة (الذباب) Diptera. ونتيجة لعملية ارتباط السم تحدث تغيرات تركيبية فى السم، يتبعه تكون ثقب فى الخلية المبطنة التى حدث معها الارتباط، تؤدى إلى حدوث تحلل أسموزى قاتل.

ولقد وجد أن السموم الداخلية كانت سامة – كذلك – لبعض الأنواع النيماتودية؛ فوجد – مثلاً – أن السم CryB كان سامًّا للنيماتودا *Caenorhabditis elegans* (عن Atkinson وآخرين ٢٠٠٣).

وكما أسلفنا .. فإن سُم الـ Bt لا يكون فعّالاً إلاّ إذا التصق مع الجدر المعوية للحشرة، فإن لم يحدث هذا الالتصاق فإن السم لا يكون مؤثرًا. وليست لجميع سلالات *B. thuringiensis* تلك العلاقة مع جميع الأنواع الحشرية، فبعضها يتخصص - فقط - على حشرات رتبة حرشفية الأجنحة lepidoptera، بينما توجد سلالات متخصصة على حشرات غمدية الأجنحة coleoptera، أو ثنائية الأجنحة diptera، أو حتى على النيماتودا.

على الرغم من أن قتل وتجفيف البكتيريا *B. thuringiensis* ذاتها، ورش المسحوق الناتج عن ذلك على النباتات يؤدى إلى قتل الحشرات الحساسة للسلالة المستعملة من البكتيريا، إلا أن سُم الـ Bt الذى ينطلق من البكتيريا سريعًا ما يتحلل ويختفى من النباتات ويصبح عديم المفعول فى المكافحة.

ولكن وجد عند نقل الجين المسئول عن إنتاج سُم الـ Bt من *B. thuringiensis* إلى البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* أن السم يبقى داخل البكتيريا بعد قتلها وتجفيفها، وبذلك يبقى ثابتًا بعد رش البكتيريا على النباتات

ونظرًا لأن البكتيريا تُستعمل فى المكافحة بعد قتلها، لذا . فإنه لا يوجد أى ضرر من استعمالها، ولكن الضرر يمكن أن يحدث إذا ما رشت البكتيريا الحية لأن تلك البكتيريا تتواجد بصورة طبيعية على الأسطح الورقية، فإذا ما انتقل الجين الـ Bt من السلالة المرشوشة المحولة وراثيًا إلى السلالات الطبيعية لكان هناك احتمال الخطر من استمرار تناول الإنسان لها على الدوام فى طعامه.

وتجدر الإشارة إلى أن تلك الطريقة فى المقاومة لا تكون فعالة ضد الحشرات التى تعيش على الأجزاء تحت الأرضية من النبات كالجذور والدرنات، والتى لا يصلها محلول الرش (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

وحاليًا يعد السُم الحشرى الـ βt δ-endotoxin - من البكتيريا *B. thuringiensis* - أهم وسائل الهندسة الوراثية لمكافحة الحشرات، وقد وصلت مبيعات بذور الذرة

والقطن وتقاوى البطاطس المهندسة وراثيًّا بجين الـ Bt أرقامًا قياسية، كما حولت وراثيًّا بالجين ذاته محاصيل: البرسيم الحجازى، والتفاح، والباذنجان، والحور، والأرز، والتبغ، والطماطم، والجوز.

ومن أهم مميزات الـ βt δ-endotoxin عدم استمرار تواجده فى البيئة لفترة طويلة، وفاعليته ضد مجموعة محددة من الآفات الحشرية، وعدم سميته لمعظم النباتات والحيوانات، وكذلك عدم سميته للإنسان. تُحدث هذه السموم ثقوبًا وتحللاً بالخلايا فى الأمعاء الوسطى لليرقات، عند تركيزات تقدر بالجزء فى البليون.

وحديثًا .. أصبحت المقاومة للحشرات بهذه الطريقة محل تساؤلات بعد أن اكتشفت حالات المقاومة للـ βt δ-endotoxin فى بعض الحشرات (عن Bent & Yu ١٩٩٩).

تقسيم السلالات البكتيرية والسموم التى تنتجها

يعتمد تقسيم سلالات *Bacillus thuringiensis* العديدة التى تم اكتشافها على أساس سيرولوجى يقوم على تفاعلات الترسيب بين الخلايا البكتيرية الهدبية مع antisera تم إنتاجها ضد الأهداب أو الخلايا البكتيرية الخضرية. ويعرف حاليًّا أكثر من ثلاثين طرازًا سيرولوجيًّا، والعدد فى ازدياد. وعلى الرغم من عدم وضوح الأهمية البيولوجية للتفاعل السيرولوجى فإنه مازال هو الأساس الذى يبنى عليه تقسيم هذه البكتيريا، علمًا بأنه لا علاقة له بنشاط البكتيريا كمنتج للسم الحشرى.

وجد الباحثون سلالات جديدة من *B. thuringiensis* أقوى تأثيرًا فى سميتها، وأخرى مؤثرة على يرقات حشرات أخرى غير حرشفيات الأجنحة. كذلك يحاول الباحثون هندسة جينات منتجة للبروتين البلّورى تكون أقوى سمية أو أوسع تأثيرًا.

وكما أسلفنا .. فإن السلالة البكتيرية الواحدة يمكنها إنتاج عددًا من البروتينات البلّورية، علمًا بأن تلك البروتينات تتباين كثيرًا فى خصائصها وفى تأثيراتها (جدولا ١٥-٦، و ١٥-٧) (عن Peferon ١٩٩٧).

وقد أمكن تعريف ما لا يقل عن ٦٠ جين من تلك الخاصة بالبروتينات البلورية Bt crystal protein genes، وذلك على مستوى النيكليوتيدات.

وتقسم هذه الجينات إلى خمس مجموعات رئيسية حسب تأثيراتها العامة التى تتخصص فيها، كما يلى:

١ – مجموعة CryI . وهى سامة لحرشيفات الأجنحة.

٢ – مجموعة CryII وهى سامة لكل من حرشيفات الأجنحة، وثنائية الأجنحة (الذباب)

٣ – مجموعة CryIII .. وهى سامة لغمدية الأجنحة

٤ – مجموعة Cry IV .. وهى سامة لثنائية الأجنحة.

٥ – مجموعة خاصة تأخذ الاسم cry VI .. وهى نشطة ضد النيماتودا (عن Chen وآخرين ١٩٩٥).

وحاليًا . تقسم تلك البروتينات على أساس تتابعاتها من الأحماض الأمينية فقط، وليس على أساس المجموعات الحشرية التى تتأثر بها، كما كان الحال فى بداية العهد بتقسيمها (عن Peferoen ١٩٩٧).

التقدمات فى عمليات التحول الوراثى وجينات الـ Cry الأكثر شيوعاً

الجينات والبروتينات والسلالات البكتيرية الشائعة الاستعمال

إن بروتينات الـ Bt التى يُعَبَّر عنها حاليًا فى المحاصيل الزراعية المحولة وراثيًا هى من الطرازين CryI، و CryIII من الـ d-endotoxins، وهى التى تعرف بفاعليتها فى مقاومة عديد من الآفات الحشرية من كل من رتبتى حرشفية الأجنحة وغمدية الأجنحة. وقد أفاد استمرار غربلة وتقييم سلالات الـ BT فى اكتشاف d-endotoxins ذات صفات مفيدة ونشطة ضد حشرات أخرى إضافية. وعلى سبيل المثال .. وجدت d-endotoxins تنتمى إلى طراز Cry II ذات نشاط ضد بعض الآفات الرئيسية من حرشفية الأجنحة.

جدول (١٥-٦): تقسيم جينات البروتينات البلّورية للبكتريا *Bacillus thuringiensis* (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

عائلة الـ cry gene	حجم البروتين	سلالة *B. thuringiensis* أو تحت النوع	الآفات الحساسة لها
cry1 Aa(1-14)	133	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry1 Ab(1-16)	130	berliner	حرشفية الأجنحة
cry1 Ac(1-15)	133	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry1 Ad-g	133	aizawai	حرشفية الأجنحة
cry1 Ba(1-4)	140	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry1 Bb-g	1340	EG5847	حرشفية الأجنحة
cry1 Ca(1-8)	134	entomocidus	حرشفية الأجنحة
cry1 Cb(1-2)	133	galleriae	حرشفية الأجنحة
cry1 Da(1-2)	132	aizawai	حرشفية الأجنحة
cry1 Db(1-2)	131	BTS00349A	حرشفية الأجنحة
cry1 Ea(1-6)	133	kenyae	حرشفية الأجنحة
cry1 Eb1	134	aizawai	حرشفية الأجنحة
cry1 Fa(1-2)	134	aizawai	حرشفية الأجنحة
cry1 Fb(1-5)	132	Morrisoni	
cry1 Ga(1-2)	132	BTS00349A	
cry1 Gb(1-2)	133	wuhanensis	حرشفية الأجنحة
cry1 Ha-b	133	BTS02069AA	
cry1Ia(1-9)	81	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry1Ib-e	81	entomocidus	حرشفية الأجنحة وغمدية الأجنحة
cry1Ja-d	133	EG5847	حرشفية الأجنحة
cry1Ka1	137	morrisoni	حرشفية الأجنحة
cry2Aa(1-10)	71	kurstaki	حرشفية الأجنحة وثنائية الأجنحة
Cry2Ab(1-5)	71	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry2Ac(1-2)	70	shanghai	حرشفية الأجنحة
cry3Aa(1-7)	73	tenebrionis	غمدية الأجنحة
cry3Ba(1-2)	75	tolworthi	غمدية الأجنحة
Cry3Bb(1-3)	74	EG4961	غمدية الأجنحة
cry3Ca1	73	kurstaki	غمدية الأجنحة

تابع جدول (١٥-٦).

عائلة الـ cry gene	حجم البروتين	سلالة *B. thuringiensis* أو تحت النوع	الآفات الحساسة لها
cry4Aa(1-3)	135	israelensis	ثنائية الأجنحة
cry4Ba(1-5)	128	israelensis	ثنائية الأجنحة
cry5Aa1	152	darmstadiensis	النيماتودا
cry5Ab1	142	darmstadiensis	النيماتودا
Cry5Ac1	135	PS86Q3	غشائية الأجنحة
cry5Ba1	140	PS86Q3	غشائية الأجنحة
cry6Aa(1-2)		PS52A1	النيماتودا
cry6Ba1		PS69D1	النيماتودا
cry7Aa1	129	galleriae	غمدية الأجنحة
cry7Ab(1-2)	130	dakota	غمدية الأجنحة
cry8A-D	131	kumamoroensis	غمدية الأجنحة
cry9Aa(1-2)	130	galleriae	حرشفية الأجنحة
cry9Ba1		galleriae	حرشفية الأجنحة
cry9Ca1	130	tolworthi	حرشفية الأجنحة
cry9Da(1-2)	132	japonensis	
cry10Aa1	78	israelensis	ثنائية الأجنحة
cry11Aa(1-2)	72	israelensis	ثنائية الأجنحة
cry11Ba-b	81	jegathesan	ثنائية الأجنحة
cry12-40	--	--	متنوعة

وقد نشأت تلك البروتينات الـ CryII من سلالة معروفة جيدًا من Bt هي السلالة HD-1 التي تنتج - كذلك - الطراز CryI الذى سبق التعرف عليه، علمًا بأن كلا الطرازين البروتينين - CryI، و CryII - يختلفان تركيبيًا بوضوح، ويختلفان في طريقة ارتباطهما بالأغشية المبطنة للغشاء المعدى لليرقة. ويعتقد بأن تلك الاختلافات قد تفيد في المساعدة على مقاومة الحشرات التي طورت مقاومة للطراز البروتيني CryI (عن Corbin وآخرين ١٩٩٨).

جدول (١٥-٧): مدى البروتينات البلّورية السامة للحشرات فى مختلف سلالات البكتيريا *Bacillus thuringiensis* (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

سلالات وتحت أنواع *B. thuringiensis*	البروتينات البلورية التى تنتجها
aizawai	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry9Ea, Cry39Aa, Cry40Aa
entomocidus	Cry1Aa, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ib
galleriae	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Da, Cry1Cb, Cry7Aa, Cry8Da, Cry9Aa, Cry9Ba
israelensis	Cry10Aa, Cry11Aa
japonensis	Cry8Ca, Cry9Da
Jegathesan	Cry11Ba, Cry19Aa, Cry24Aa, Cry25Aa
kenyae	Cry2Aa, Cry1Ea, Cry1Ac
kumamotoensis	Cry7Ab, Cry8Aa, Cry8Ba
kurstaki HD-1	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab
kurstaki HD-73	Cry1Ac
kurstaki NRD-12	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac
morrisoni	Cry1Bc, Cry1Fb, Cry1Hb, Cry1Ka, Cry3Aa
tenebrionis	Cry3Aa
tolworthi	Cry3Ba, Cry9Ca
wuhanensis	Cry1Bd, Cry1Ga, Cry1Gb

وسائل تحسين التعبير الجينى

لقد لوحظ انخفاض مستوى تعبير الجين Bt فى بعض النباتات المحولة وراثيًّا، ولكن أمكن زيادة هذا التعبير من خلال اختيار الـ promoters المناسبة (جدول ١٥-٨)، أو بتحوير منطقة التشفير coding region بالجين Bt. ولقد تحقق تنشيط فعل الجين باستعمال نسختين من الـ constitutive 35S promoter من فيرس موزايك القنبيط.

كذلك استعملت جينات Bt مخلقة أعيد تشكيلها بزيادة محتواها من الـ GC .. استعملت فى بعض من تلك المحاصيل (جدول ١٥-٩)، وأظهرت تلك الطرز المخلقة - فى كثير من الأحيان - زيادة مقدارها ٥٠٠ ضعف فى التعبير الجينى.

ومن الوسائل الأخرى التى اتبعت لزيادة التعبير الجينى إجراء تحويرات فى الجين والحصول على انعزالات من الطرز المحورة، بهدف قصر التعبير الجينى على الأنسجة التى تضار من النشاط الحشرى فقط (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الإنجازات على المستوى التجارى

من بين الشركات الأمريكية التى أجرت اختبارات حقلية لنباتات محولة وراثيًا بالجين Bt، أو اعتُمدت اختباراتها الحقلية بواسطة وزارة الزراعة الأمريكية، ما يلى (Chrispeels & Sodava ٢٠٠٣)

الشركة	المحصول
Monsanto	البطاطس – القطن – الطماطم – الذرة
Calgene	القطن – التبغ – البطاطس
CIBA-GEIGY	التبغ – الذرة
Agrigentics	لفت الزيت (الكانولا)
Campbell Institute R & T	الطماطم
Rohm & Haas	التبغ
Roger NK Seed	الطماطم
Frito-Lay	البطاطس
Delkab	الذرة
Northrup King	الذرة
Dow Gardens	الغُبيراء Serviceberry

ومن بين الأصناف الجديدة التجارية التى أدخلت فى الزراعة وتحمل الجين Bt الأصناف: Bollgard، و Maximizer، و Yield Gard من القطن، و New Leaf من البطاطس (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

ويعطى جدول (١٥-١٠) قائمة بأصناف بعض المحاصيل الزراعية الهامة التى أنتجتها بعض شركات التكنولوجيا الحيوية لمقاومة أنواع حشرية متنوعة.

جدول (١٥-٨): الـ promoters التى استخدمت مع جينات الـ Cry فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الـ Promoter	المصدر	موقع التعبير	البروتين البلورى	النباتات التى حولت وراثيًا
Mannopine synthase TR	*Agrobacterium* Ti plasmid	معظم الأنسجة النباتية	Cry1Ab	التبغ والبطاطس
Phytohaemagglutinin (PHA-L)	الفاصوليا	البذور	a-AI-Pv	البسلة وفاصوليا أدزوكى والتبغ
CaMV 35S	Cauliflower mosaic virus	معظم الأنسجة النباتية	Most proteins	معظم النباتات
Sucrose synthase (RSs1)	الأرز	اللحاء	GNA	التبغ
Metallothionein-like (MT-L)	الذرة	الجذور	Cry1Ab	الذرة
Phosphoenolpyruvate Carboxylase (PEPC)	الذرة	الأنسجة الخضراء	Cry1Ab	الذرة والأرز
Pollen-specific	الذرة	حبوب اللقاح	Cry1Ab	الذرة
Tryptophan synthase α-subunit (trpA)	الذرة	النخاع	Cry1Ab	الذرة
Ubiquitin-1 (Ubi-1)	الذرة	كل الأعضاء النباتية	Cry1Ac	الأرز
Proteinase inhibitor II (Pot PI-II)	البطاطس	يستحث بفعل الجروح	Pot PI-II, ipt	الأرز والتبغ والطماطم
rRNA operon (Prrn)		البلاستيدات الخضراء	Cry1Ac	التبغ
Actin-1 (Act-1)	الأرز	كل الأعضاء النباتية	CpTI	الأرز
Pathogenesis-related protein-1a (PR-1a)	التبغ	يستحث كيميائيًا	Cry1Ab	التبغ

جدول (١٥-٩): تحولات وراثية لمقاومة الحشرات اعتمدت على جينات Bt مخلقة (عن Mandaokar وآخرين ١٩٩٩).

النبات	الجين	بروتين الـ Bt (كنسبة مئوية من البروتين الذائب)	الحشرة المستهدفة
القطن	cry1Ab/	٠,١	*Heliothis zea*
	cry1Ac		*Pectinophora gossypiella*
البطاطس	cry3A	٠,٣	*Leptinotarsa decemlineata*
الذرة	cry1Ab	٠,١٧	*Ostrinia nubilalis*
الأرز (*japonica*)	cry1Ab	٠,٠٥	*Chilo suppressalis*
الأرز (*indica*)	cry1Ac	٠,٠٢٥	*Scirpophaga incertulas*
الطماطم	cry1Ab	٠,٣	*Heliothis zea*
التبغ	cry1Ab	٠,٠٣	*Heliothis virescens*
البادنجان	cry1Ab	٠,٠٣	*Leucinodes orbonalis*
لفت الزيت	cry1Ac	٠,٤	*Plutella xylostella*
البرسيم الحجازى	cry1C	٠,٢	*Spodoptera litoralis*

كسر مقاومة الجين Cry

عند زراعة الأصناف المعدلة وراثيًا المحتوية على الجين Cry على نطاق واسع، فإن الضغط الانتخابى على الحشرات لتطوير سلالات جديدة مقاومة للسم الذى ينتجه هذا الجين يكون قويًا؛ الأمر الذى يؤدى إلى ظهور السلالات المقاومة، ثم انتشارها مع استمرار زراعة الأصناف المعدلة وراثيًا (عن Bergelson وآخرين ١٩٩٩)

وتعرف عدة حالات كسرت فيها الحشرات المقاومة الحشرية فى النباتات المحولة وراثيًا، وخاصة فى تلك التى حصلت على جين المقاومة الحشرية من *Bacillus thuringiensis*. ولعل أبرز مثال على ذلك المقاومة التى تطورت فى الفراشة ذات الظهر الماسى *Plutella xylostella* ضد سموم الـ Cry1A فى كل من الفيلبين، وهاواى، وفلوريدا، وكذلك ضد Cry1F فى هاواى. ولقد بدا واضحًا أن مقاومة تلك الحشرة لهذه السموم يتحكم فيها جين واحد أو عدد قليل من الجينات. وجدير بالذكر أن هذه

الحشرة – على وجه الخصوص – قد طورت مقاومة ضد معظم المبيدات الحشرية فى عديد من دول العالم (عن Roush ١٩٩٧).

جدول (١٥-١٠): الأصناف التجارية التى أنتجتها شركات التكنولوجيا الحيوية من بعض المحاصيل الاقتصادية الهامة (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

الشركة	الصنف	بروتين الـ Bt	المحصول	الحشرات المستهدفة
Monsanto	New-Leaf	Cry3A	البطاطس	Colorado beetle
Monsanto	Bollgard	Cry1Ac	القطن	Tobacco budworm, cotton bollworm, pink bollworm
Monsanto	YieldGard	Cry1Ab	الذرة	European corn borer
Novartis	YieldGard Knockout			
Mycogen	NaturGard			
DeKalb	Br-Xtra	Cry1Ac	الذرة	European corn borer
Aventis	StarLink	Cry9C	الذرة	European corn borer
Mycogen Pioneer	Herculex I	Cry1F	الذرة	European corn borer
Monsanto		Cry3Bb	الذرة	Corn rootworm larvae

كذلك أمكن تطوير سلالات حشرية مقاومة للبروتين البلَّورى معمليًّا، وذلك من كل من الأنواع الحشرية: *Plodia interpunctella*، و *Cadra cautella*، و *Heliothis virescens*. وقد تراوح مقدار الزيادة فى مقاومة التأثير السام للبروتين البلّورى بين ٢٤٪، وأكثر من ٢٥٠٪. وفى هاواى وجدت فى الحقول التى استعملت فيها *B. thuringiensis* فى المقاومة الحشرية – رشًّا – بكثافة عالية ولفترة طويلة .. وجدت عشائر من الحشرة ذات الظهر الماسى *Plutella xylostella* كانت أكثر مقاومة للبكتيريا بمقدار ٤١ ضعف.

وعلى الرغم من أن *Plodia interpunctella* قد طورت مقاومة لبعض سلالات البكتيريا، فإن هذه السلالة الحشرية المقاومة كانت حساسة لسلالات بكتيرية أخرى. ليس هذا فقط، بل إن السلالة الحشرية التى طورت مقاومة ضد السم المنقى CryIA(b))

أصبحت أكثر حساسية للسم البلّورى CryIC. وقد تبين أن المقاومة للبروتين البلّورى CryIA(b) ترتبط بانخفاض قدره ٥٠٪ فى ألفة الغشاء الخلوى على استقبال البروتين، بينما ارتبطت زيادة حساسيتها للبروتين CryIc بزيادة فى مواقع الالتحام بينه وبين الخلايا المبطنة للمعى الحشرية (عن Peferoen ١٩٩٢).

ولقد طورت استراتيجيات للتعامل مع مشكلة مقاومة الحشرات للسُم البكتيرى، وجميعها تعتمد على بقاء الآليل الحشرى الخاص بمقاومة السُم البكتيرى منخفضا، حيث يتسنى للأفراد الحساسة - التى تحتوى على الآليل الحشرى الخاص بالحساسية للسُم البكتيرى - أن تكتسح الأفراد المقاومة.

ومن بين هذه الاستراتيجيات، ما يلى:

١ - اتباع دورة زراعية تتبادل فيها المحاصيل المعدلة وراثيًا بالجين Bt مع المحاصيل غير المعدلة وراثيًا، أو أن تتنوع فى الأصناف المزروعة فيها سموم الـ Bt.

٢ - استعمال أصناف محولة وراثيًا بأكثر من واحد من سموم الـ Bt، مع اختلافها فى طبيعة فعلها.

٣ - توفير ملجأ لتكاثر الحشرة العادية غير المقاومة لسموم الـ Bt، إما بالتعبير عن جينات الـ Bt فى أنسجة معينة من النباتات المحولة وراثيًا ذاتها، أو بزراعة أصناف محولة وراثيًا وأخرى غير محولة فى الحقل ذاته، أو فى حقول متجاورة. يؤدى ذلك إلى إبطاء عملية تطور وظهور سلالات حشرية جديدة مقاومة.

٤ - التعبير القوى جدًّا لجينات الـ Bt فى النباتات المعدلة وراثيًا، مما يزيد من صعوبة ظهور السلالات المقاومة.

٥ - الحد من حجم عشيرة الحشرة - بهدف الحد من التباينات الوراثية التى قد تظهر فيها والتى قد تتضمن المقاومة - وذلك بالجمع بين زراعة الأصناف المقاومة ووسائل المكافحة الأخرى، مثل استعمال الأعداء الطبيعية (عن Mandaokar وآخرين ١٩٩٩، و Bent & Yu ١٩٩٩).

وقد قارن Roush (١٩٩٤) تأثير مقاومة الحشرات بتحويلها وراثيًا بالجين Bt مع

المقاومة بالرش بالتحضيرات التجارية من البكتيريا *Bacillus thuringiensis*، وذلك على ضوء ما ابداه بعض الحشريين من أن فرصة ظهور سلالات حشرية مقاومة تكون أقل عند الرش بالبكتيريا عما يكون عليه الحال عند زراعة النباتات المحولة وراثيًا. يذكر الباحث - بداية - أن التحضيرات التجارية من البكتيريا لا تخلط - غالبًا - بالمبيدات الحشرية الكيميائية، وليس من المحتمل أن تكون بديلاً عنها. وبالمقارنة .. فإن استعمال النباتات المحولة وراثيًا فى الزراعة يمكن أن يحل كلية محل الرش بالمبيدات الكيميائية؛ مما يجعل لاستعمالها قيمة كبيرة فى حماية البيئة. كذلك أظهرت الدراسات المختبرية على كل من الفراشة ذات الظهر الماسى *Plutella xylostella* وفراشة الدقيق الهندية *Plodia interpunctella* أن النباتات التى تحمل جين Bt واحد تكون أكثر كفاءة فى تأخير ظهور المقاومة الحشرية عن الرش بالبكتيريا. كما وجد أيضًا أن سلالات خنفساء كلورادو *Leptinotarsa decemlineata* التى طورت معمليًا لمقاومة الرش بالبكتيريا لم تكن قادرة على إصابة النباتات المحولة وراثيًا؛ مما يعنى أن طبيعة المقاومة الحشرية تختلف بين حالتى الرش بالبكتيريا واستعمال النباتات المحولة وراثيًا. وأخيرًا .. فإن استعمال نباتات محولة وراثيًا بجينين من جينات الـ Bt تزيد - كثيرًا - من احتمالات تطوير حالات المقاومة الحشرية.



الفصل السادس عشر

الهندسة الوراثية لمقاومة الفطريات والبكتيريا

تتنوع كثيرًا مصادر الجينات التي تستعمل في عمليات التحول الوراثي لمقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية في النباتات، كما تتنوع - بالتالي - الآلية التي تعمل بها تلك الجينات.

الاعتماد على جينات المقاومة الطبيعية في عمليات التحول الوراثي

يعد الاعتماد على جينات المقاومة الطبيعية التي تتوفر في شتى الأنواع النباتية ضد مختلف المسببات المرضية الفطرية والبكتيرية طريقة مؤكدة - غالبًا - لتحقيق المقاومة لتلك المسببات المرضية في الأنواع النباتية المستهدفة بعملية التحول الوراثي، ولكن يتعين - بطبيعة الحال - عزل تلك الجينات أولاً حتى يمكن نقلها من نوع نباتي لآخر بعيد عنه.

وتظهر في جدول (١٦-١) قائمة بعدد من أهم جينات المقاومة الطبيعية التي استخدمت أو تستخدم في عمليات التحول الوراثي.

ومن بين المركبات الكثيرة ذات الأصل النباتي، والتي تنتج من قبل النباتات كرد فعل للإصابة بمختلف المسببات المرضية من أجل مقاومتها، والتي يمكن الاستفادة منها في التحويل الوراثي للنباتات لجعلها أكثر مقاومة للمسببات المرضية، ما يلي:

١ - النشاط العالي لإنزيم البيروكسيديز peroxidase.

٢ - إنزيمات البروتينيز proteinases.

٣ - إنزيمات الهيدروليز hydrolases.

٤ - مجموعة من البروتينات المضادة للفطريات - مثل البروتين زياماتين zeamatin -

وهى تعمل من خلال تأثيرها على نفاذية الأغشية الخلوية بالفطريات (عن Mount & Berman ١٩٩٤).

جدول (١٦-١): قائمة بعدد من أهم جينات المقاومة الطبيعية للمسببات المرضية التى أمكن عزلها لأجل استخدامها فى عمليات التحول الوراثى (عن Dickinson ٢٠٠٣).

فئة البروتين المسئول عن المقاومة	طبيعة البروتين المسئول عن المقاومة[أ]	الجين المنتج للبروتين	النبات الحامل للجين	المسبب المرضى الذى يقاومه الجين
١	TIR-NBS-LRR	L	الكتان	*Melampsora lini* (fungus)
		M	الكتان	*Melampsora lini* (fungus)
		P	الكتان	*Melampsora lini* (fungus)
		N	التبغ	*Tobacco mosaic virus*
		RPP1	*Arabidopsis*	*Peronospora parasitica* (oomycete)
		RPP5	*Arabidopsis*	*Peronospora parasitica* (oomycete)
		RPS4	*Arabidopsis*	*Pseudomonas syringae* (bacterium)
	CC-NBS-LRR	*Prf*	الطماطم	*Pseudomonas syringae* (bacterium)
		Mi	الطماطم	*Melodogyne incognita* (nematode)
		Gpa2/Rx1	البطاطس	*Globodera* (nematode) & Potato virus X
		RPS2	*Arabidopsis*	*Pseudomonas syringae* (bacterium)
		RPS5	*Arabidopsis*	*Pseudomonas syringae* (bacterium)
		RPM1	*Arabidopsis*	*Pseudomonas syringae* (bacterium)
		RPP8/HRT	*Arabidopsis*	*Peronospora & Turnip crinkle virus*
	NBS-LRR	*Bs2*	الفلفل	*Xanthomonas campestris* (bacterium)
		Dm3	الخس	*Bremia lactuca* (oomycete)
		I2	الطماطم	*Fusarium oxysporum* (fungus)
		Cre3	القمح	*Heterodera avenae* (nematode)
		Xa1	الأرز	*Xanthomonas oryzae* (bacterium)
		Pib	الأرز	*Magnaporthe grisea* (fungus)
		Pi-ta	الأرز	*Magnaporthe grisea* (fungus)
		Rp1	الذرة	*Puccinia sorghi* (fungus)
		Mla	الشعير	*Blumeria graminis* (fungus)

تابع جدول (١٦-١).

المسبب المرضى الذى يقاومه الجين	النبات الحامل للجين	الجين المنتج للبروتين	طبيعة البروتين المسئول عن المقاومة[أ]	فئة البروتين المسئول عن المقاومة
Ralstonia solanacearum (bacterium)	*Arabidopsis*	*RRS1-R*	TIR-NBS-LRR-NLS-WRKY	
Cladosporium fulvum (fungus)	الطماطم	*Cf-2, Cf-4 Cf-5, Cf-9*	LRR-TM	٢
Pseudomonas syringae (bacterium)	الطماطم	*Pto*	Kinase	٣
Pseudomonas syringae (bacterium)	*Arabidopsis*	*PBS1*		
Puccinia graminis (fungus)	الشعير	*Rpg1*	Kinase-kinase	
Xanthomonas oryzae (bacterium)	الأرز	*Xa21*	LRR-TM-Kinase	٤
Innate immunity (flagellin)	*Arabidopsis*	*FLS2*		
Heterodera schachtii (nematode)	بنجر السكر	*HS1[pro-1]*	Unique	٥
Erysiphe (fungus)	*Arabidopsis*	*RPW8*	Unique	٦
Blumeria graminis (fungus)	الشعير	*Mlo*	Membrane protein	٧
Verticillium albo-atrum (fungus)	الطماطم	*Ve1*	Cell-surface glycoprotein	٨
Cochliobolus carbonum (fungus)	الذرة	*Hm1*	Toxin reductase	٩

أ - اختصارات طبيعة البروتين المسئول عن المقاومة:

TIR = Toll interleukin receptor; LRR = leucine-rich repeat; NBS = nucleotide binding site; CC = coiled coil; NLS = nuclear localisation signal; WRKY = transcription factor; and TM = transmembrane.

الاعتماد على الجينات التى تتحكم فى إنتاج البروتينات المضادة للفطريات

تعتمد خاصية المقاومة فى حالة هندسة نباتات تحمل جينات تتحكم فى إنتاج بروتينات مضادة للفطريات على قدرة النباتات التى حولت وراثيًّا على إنتاج إنزيمات معينة تكون مدمرة للفطريات التى يمكن أن تهاجم تلك النباتات.

ومن بين البروتينات ذات العلاقة بالحماية من الإصابات المرضية فى النباتات تلك التى تلعب دورا فى عملية اللجننة lignification، وفى تمثيل الفيتو ألاكسينات phytoalexins، وكذلك إنزيمات الشيتينيز chitinases، والـ β-1,3-glucanases، ومثبطات البروتينيز proteinase inhibitors، والبروتينات المثبطة لعمل الريبوسومات ribosome inactivating proteins (عن Nascari & Montanelli ١٩٩٧).

كذلك يفيد استخدام الجينات التى تشفر لتكوين البولى ببيتيدات الصغيرة الغنية فى السيستين، مثل الثيونينات thionins، والهيفينات heveins، وهى المركبات التى تؤدى إلى تدهور الأغشية الخلوية للفطريات، كما تقوم الأخيرة بربط الشيتين فى الجدر الخلوية للفطريات (عن Williamson ٢٠٠٢)

ومن أكثر الجينات أهمية فى عمليات هندسة النباتات لمقاومة الفطريات عن طريق البروتينات المضادة لها antifungal protein-mediated resistance الجينين المتحكمين فى إنتاج كل من الشيتينيز chitinase، والجلوكانيز glucanase، حيث يعمل هذان الإنزيمان على الجدر الخلوية للفطريات المهاجمة للنباتات؛ مما يجعلها أكثر حساسية لقوى الدفاع الطبيعية العادية للنباتات (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

وتجدر الإشارة إلى أن الاستعانة بالجينات التى تحلل الجدر الخلوية للبكتيريا والفطريات – بهدف مقاومة النباتات لها – ليس لها أى تأثير على الجدر الخلوية للنباتات التى تختلف – تمامًا – فى تركيبها – عن الجدر الخلوية للبكتيريا والفطريات

إنزيمات الشيتينيز والجلوكونيز

تتكون الجدر الخلوية للفطريات من مكونين، هما الجلوكان glucan، والشيتين chitin، وهما اللذان يمكن تحللهما بواسطة كل من الـ glucanases (مثل β-1,3-glucanase) والـ chitinases – على التوالى، هذا . إلا أن تركيب الشيتين يتباين كثيرًا بين الأنواع الفطرية المختلفة، ولذا فإن إنزيم الشيتينيز chitinase الذى يكون فعالاً

ضد أحد الفطريات لا يلزم – بالضرورة – أن يكون فعالاً ضد الفطريات الأخرى، بما يعنى أن نجاح إكساب النباتات صفة المقاومة لفطر ما بطرق الهندسة الوراثية التى تعتمد على تحويلها وراثيًا باستعمال إنزيم الشيتينيز يعتمد على الاختيار المناسب للإنزيم الذى يكون فعالاً ضد الفطر المعنى (عن Broglie & Broglie ١٩٩٤، و Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

وكان Brooglie وآخرون (١٩٩٣) قد قدما شرحًا لعملية التحول الوراثى للتبغ بجين الفاصوليا endochitnase، والذى أدى التعبير عنه فى التبغ إلى جعله مقاومًا للفطر *Rhizoctonia solani*. ومن المعتقد أن مرد ذلك كان إلى تحليل الإنزيم لشيتين الجدر الخلوية للفطر.

ومن المعروف أن البكتيريا *Serratia marcescens* وكائنات دقيقة أخرى كثيرة تفرز طرزا مختلفة من الإنزيمات التى تعمل على تحليل الشيتين chitinases، وهى التى ثبتت فاعليتها ضد الفطريات، التى تحتوى جدرها الخلوية على الشيتين chitin كمكون أساسى. كذلك ربما يكون لتلك الإنزيمات تأثيرات ضارة على الحشرات والنيماتودا. ولكن يتعين تحديد إنزيم الشيتينيز chitinase المناسب للعمل ضد المسببات المرضية المعنية. وقد يبدو من المفيد نقل جينات تتحكم فى إنتاج عدة إنزيمات شيتينيز مرة واحدة لأجل الحصول على مدى واسع من المقاومة.

وتجدر الإشارة إلى أن النباتات ذاتها يمكن أن تنتج إنزيمات الشيتينيز – ضمن مركبات أخرى – استجابة للإصابة بالمسببات المرضية (Mount & Berman ١٩٩٤).

وبينما يكون نشاط الشيتينيز فى النباتات السليمة غير المصابة منخفضًا، أو غير ملحوظ، فإن ذلك النشاط يزداد بوضوح بعد الإصابة بأحد الفطريات المرضة، أو بعد المعاملة بأحد المثيرات elicitors. وبينما يحمى الشيتينيز النباتات من الإصابة بالفطريات التى تحتوى على شيتين chitin فى جدرها الخلوية، فإنه لا يكون مؤثرًا على الفطريات التى يعوزها الشيتين (عن Nascari & Montanelli ١٩٩٧).

وقد أمكن التعرف فى النباتات على خمس طرز (من I إلى V) من إنزيمات الـ

endochitinases، وعلى ثلاثة طرز (I إلى III) من إنزيمات الـ β-1,3-endoglucanases. وعلى خلاف الـ isoforms الخلوية intercellular من طراز II chitinases، فإن الـ isoforms التي توجد بالفجوات العصارية vacular من طراز I chitnases، وطراز β-1,3-glucanases I ثبت أنها مثبطات قوية جدًّا لنمو الفطريات في البيئات الصناعية، حيث تعمل معًا بصورة تداؤبية synergistically. يحدث هذا التداؤب – كذلك – بين الـ chitinases V والـ β-1,3-glucanases الخلويين.

وقد ازدادت مقاومة الطماطم للإصابة بالفطريات عندما حولت وراثيًا بكل من طراز I من إنزيم الشيتينيز class I chitinase، وطراز I من إنزيم بيتا ١، ٣ جلوكانيز class I β-1,3-glucanase من التبغ. بينما لم يؤد التحول الوراثي للطماطم بأي من الجينين على انفراد إلى حمايتها من الإصابة الفطرية. ولقد بلغ مقدار النقص في شدة الإصابة بالفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* في نباتات الطماطم المحولة وراثيًّا المقاومة، مقارنة بالوضع في النباتات غير المحولة وراثيًّا: ٣٦٪، و ٥٨٪، وذلك في سلالتين محولتين وراثيًا من الطماطم. وقد حدث تخلص كامل من الإصابة الأولية بالفطر في سلالتين محولتين وراثيًا، في الوقت الذي كانت فيه نباتات المقارنة قد قتلها الفطر. وتتفق تلك النتائج مع ما هو معروف من أن كلا الإنزيمين class I chitinase، و class I β-1,3-glucanase يعملان – تداؤبيًّا – synergistically – على تثبيط نمو الفطريات في البيئات الصناعية (Jongedijk وآخرون ١٩٩٥).

وقد أمكن تحويل عددًا من أصناف الخيار والجزر وراثيًّا بجينات مختلفة للشيتينيز chitinase حُصِل عليها من كل من البيتونيا، والتبغ، والفاصوليا. وبينما لم تُظهر نباتات الخيار المحولة وراثيًا بأي واحد من الجينات الثلاثة أي فروق معنوية عن النباتات غير المحولة لدى عدواها بأي من الفطريات المرضة *Alternaria cucumerina*، و *Botrytis cinerea*، و *Colletotrichum orbiculare*، و *Rhizoctonia solani* فإن نباتات الجزر المحولة بجين شيتينيز التبغ أظهرت مقاومة أعلى بصورة معنوية ضد الإصابة بأي من الفطرين *R. solani*، أو *Corticium rolfsii* مقارنة بالنباتات غير المحولة وراثيًا، هذا بينما لم تظهر تلك المقاومة في نباتات الجزر المحولة وراثيًّا

بجين شيتينيز البيتونيا، وفى كليهما . لم تظهر أى مقاومة فى نباتات الجزر المحولة وراثيًّا ضد أى من الفطرين *Alternaria radicina*، أو *Thielaviopsis basicola* ويستدل من تلك النتائج على أن كفاءة التحول الوراثى بجينات الشيتينيز فى مقاومة النباتات للفطريات تتأثر بكل من النوع النباتى المحول وراثيًّا، وجين الشيتينيز المستخدم، والفطر المستهدف مقاومته (Punja & Rharjo ١٩٩٦).

كذلك أمكن تحويل الخيار وراثيًّا بجين شيتينيز من الأرز، وأظهرت النباتات المحولة وراثيًّا مستوى من المقاومة للفطر *Botrytis cinerea* أعلى من نباتات المقارنة، وتوقف فيها انتشار المرض كلية (Tabei وآخرون ١٩٩٧)

كذلك أمكن تحسين المقاومة للأمراض فى النباتات بتحويلها وراثيًّا بجينات من فطريات تستخدم فى المقاومة الحيوية فعلى سبيل المثال أمكن نقل الجين المسئول عن إنتاج شيتينيز قوى التأثير على الفطريات من *Trichoderma harzianum* إلى كل من التبغ والبطاطس، وظهرت مستويات عالية من الإنزيم المضاد للفطريات فى الأنسجة النباتية المختلفة، دون أن يكون لذلك أى تأثيرات منظورة على نمو النباتات أو تطورها ولقد أظهرت النباتات المحولة وراثيًّا تحملاً أو مقاومة تامة للفطريات *Alternaria alternata*، و *A. solani*، و *Botrytis cinerea*، و *Rhizoctonia solani*، الأمر الذى يجعلها أفضل حالاً بكثير من تلك التى تحول بجينات الشيتينيز المتحصل عليها من النباتات أو البكتيريا (Lorito وآخرون ١٩٩٨).

وأمكن تحويل البروكولى وراثيًّا بجين endochitinase حُصل عليه من *Trichoderma harzianum*، وذلك لإكسابه صفة المقاومة للفطر *Alternaria brassicicola* (Mora & Earle ٢٠٠١)

بروتينات الديفنسين

يُستفاد – كذلك من بروتينات الديفينسين definsins فى عمليات التحول الوراثى، وهى بروتينات تتواجد فى كل الخلايا الحية، ولها خصائص متنوعة، ولكنها تشترك جميعها فى كونها ببتيدات صغيرة (٢٦–٥٠ حمض أمينى) مضادة للميكروبات تُظهر

الديفينسينات نشاط انحلالى lytic بالارتباط داخل الغشاء البلازمى الميكروبى، علمًا بأنه يكون من الصعب جدًّا على أى مسبب مرضى أن يطور مقاومة لهذا التأثير نظرًا لأهمية المحافظة على كمال الغشاء البلازمى لاستمرار بقاء الكائن. ومن ثم لا يمكن أن تحدث به تغيرات تمنع هذا الارتباط بين الديفينسينات وبينه

ولقد أمكن تحويل البطاطس وراثيًا بجين الديفينسين alfAFP من البرسيم الحجازى، حيث تبين تمثيل الديفينسين فى النباتات التى حولت وراثيًا وتم إفرازه فى المسافات بين الخلايا فى كل من الأوراق والجذور، وأظهرت النباتات مقاومة معنوية ضد الفطر *Verticillium dahlia*، بدرجة كانت مماثلة للمقاومة الطبيعية فى أصناف البطاطس المقاومة لهذا الفطر. إلاّ أن النباتات المحولة وراثيًا لم تكن مقاومة للفطر *Alternaria solani* (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الإنزيمات المثبطة لنشاط الريبوسومات

تفيد البروتينات المثبطة للريبوسومات ribosome-inactivating proteins (اختصارًا: RIP) فى عمليات التحول الوراثى إذ إنها تمنع الريبوسومات من القيام بعملها، ومن ثم يتوقف تمثيل البروتين ولهذه البروتينات درجات مختلفة من التخصص، وبعضها يؤثر على الثدييات (عن Williamson ٢٠٠٢).

وقد أحدث إدخال جينات تتحكم فى إنتاج البروتينات المثبطة للريبوسومات مع جين الشيتينيز أحدث ذلك تأثيرًا متداتبا synergistic ولقد نقل بالفعل جين الفجل Rs-AFP2 الذى يشفر لإنتاج مضاد الفطريات ٢ antifungal 2 .. نقل إلى التبغ الذى أظهر مقاومة للفطر *Alternaria longipes* (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

بروتينات أخرى تفيد فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الأمراض

من بين البروتينات الأخرى التى حازت باهتمام الباحثين فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الفطريات المسببة للأمراض، ما يلى

• يحتوى عنب الذئب (أو عنب الثعلب) pokeweed على بروتين مضاد

للفيروسات، وقد أظهرت نباتات التبغ التى حولت وراثيًا بالجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين تدهورًا شديدًا فى نموها، إلاّ أن إطفار هذا الجين واستخدام الجين المطفر فى عملية التحول الوراثى أدى إلى إنتاج نباتات تبغ طبيعية النمو ومقاومة للفيرس، كما كانت كذلك - وعلى غير المتوقع - مقاومة للفطر *Rhizoctonia solani*، وارتبط ذلك بإنتاج النباتات المحولة وراثيًا لعدد من البروتينات ذات العلاقة بالدفاع ضد الإصابات الفطرية (عن Williamson ٢٠٠٢).

• أمكن تحويل الطماطم وراثيًّا بالجين المسئول عن تكوين البروتين هاربين **harpin** والمتحصل عليه من البكتيريا *Erwinia amylovora* المسببة لمرض اللفحة النارية فى التفاح والكمثرى. وبعدوى النباتات بسلالة مركبة من الفطر *Phytophthora infestans* وجد أن زيادة تعبير النباتات عن الهاربين - سواء أكان ذلك ذاتيًّا أم بسبب حث المسبب المرضى على ذلك - أدى إلى انخفاض معدل نمو البقع المرضية (Li & Fan ١٩٩٩).

الاعتماد على الجينات التى تتحكم فى إنتاج مركبات مضادة للفطريات

قد يُحصل على الجينات التى تتحكم فى إنتاج المركبات المضادة للفطريات من حالات المقاومة الطبيعية كتلك التى أسلفنا بيانها (مثل الجينات التى تتحكم فى إنتاج الفيتوألاكسينات)، وقد تكون من مصادر أخرى نباتية أو غير نباتية.

الجينات التى تتحكم فى إنتاج الفيتوألاكسينات

تعد الفيتوألاكسينات phytoalexins من المركبات المضادة للكائنات الدقيقة، وتلعب - بطبيعتها - دورًا فى مقاومة النباتات للمسببات المرضية الفطرية والبكتيرية، وتعرف المقاومة التى تعتمد عليها بأنها antifungal-compound mediated resistance.

وقد أمكن تحويل الطماطم وراثيًّا وجعلها قادرة على إنتاج فيتوألاكسين نبات العنب، بهدف حمايتها من الإصابة ببعض الفطريات المرضة؛ فقد نقل إلى الطماطم جينين من جينات الـ stilbene من العنب، حيث حدث التعبير عن كليهما فى النباتات المحولة

وراثيًا ونسلها لدى عدواها بالفطر *Phytophthora infestans*، أو تجريحها، أو تعريضها للأشعة فوق البنفسجية. وحدث تراكم قوى للرنا الرسول الخاص بالإنزيم stilbene synthase لدى عدوى النباتات بكل من *P. infestans*، و *Botrytis cinerea*، حيث أمكن ملاحظته فى الأوراق بعد ٣٠ دقيقة من عدواها. ووصل هذا التراكم إلى ذروته بعد ٢٤ ساعة من الحقن الفطرى، ثم اختفى فى خلال ٧٢ ساعة. كذلك حدث تراكم قوى للمركب resveratrol، وصل ذروته بعد ٤٤ ساعة، ثم قل تدريجيًا، وأدى تواجده إلى الحد من الإصابة بالفطر *P infestans* (Thomzik وآخرون ١٩٩٧).

كذلك أمكن الاستفادة من عملية التحول الوراثى السالفة الذكر ذاتها فى مقاومة مرض العصفة فى الأرز (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

جينات المضادات الحيوية

إن أحد الاتجاهات التى يفكر فيها علماء الهندسة الوراثية لإنتاج نباتات مقاومة للأمراض (الفطرية والبكتيرية وتلك التى تسببها الفيكوبلازما)، هى بتحويلها وراثيًا لتحتوى على الجينات المتحكمة فى إنتاج أحد المضادات الحيوية المؤثرة فى المسببات المرضية المعنية، ومنها – على سبيل المثال – المضاد الحيوى nikkomycin الذى ينتجه الاستربتوميسيت *Streptomyces tendae*، والذى أوضحت الدراسات عدم سميته لفئران التجارب.

ومن أهم الاعتراضات على هذا الاتجاه فى الهندسة الوراثية، ما يلى

١ – الأخطار الصحية التى قد يتعرض لها الإنسان من جراء تناول أطعمة تحتوى على مضادات حيوية.

٢ – قد تطور الكائنات المرضة التى عُدِّلت النباتات لكى تكون مقاومة لها . قد تطور سلالات جديدة مقاومة لفعل تلك المضادات.

ويمكن الحد من تلك التأثيرات السلبية باستعمال جينات منظمة لظهور فعل جينات المضادات الحيوية، بحيث لا يظهر إلاّ فى مرحلة معينة من النمو (كالبادرات – مثلاً –

لمقاومة فطريات الذبول الطرى)، أو فى جزء معين من النبات لتجنب ظهور أمراض معينة لا تصيب إلاّ ذلك الجزء (عن Mount & Berman ١٩٩٤).

الجينات التى تتحكم فى إنتاج مركبات أخرى

من بين عمليات التحول الوراثى التى أجريت بهدف إنتاج مركبات أخرى مضادة للفطريات، ما يلى:

الأحماض الدهنية غير المشبعة

أدى تحويل الطماطم وراثيًا بجين الخميرة المسئول عن تكوين الإنزيم stearoyl-CoA desaturase إلى زيادة محتوى أوراقها من الأحماض الدهنية. ولدى اختبار مقاومتها للفطر *Erysiphe polygoni* المسبب للبياض الدقيقى، وجد أن المستعمرات الفطرية التى ظهرت عليها كانت أصغر مساحة وأقل احتواء على الجراثيم الكونيدية عما كان عليه الحال فى النباتات التى لم تحول وراثيًا. وقد أوضحت الدراسات أن إنبات جراثيم الفطر فى البيئات التى تحتوى على أحماض دهنية مختلفة تثبط معنويًا عند تواجد أحماض دهنية غير مشبعة. كذلك احتوت نباتات الطماطم المحولة وراثيًا على تركيزات أعلى من إنزيمات البيروكسيديز peroxidases عما فى النباتات غير المحولة (Wang وآخرون ١٩٩٨).

فوق أكسيد الأيدروجين

يتضمن النظام الدفاعى للنباتات ضد الإصابات المرضية إنتاج مركبات ذات قدرة عالية على الأكسدة، مثل فوق أكسيد الأيدروجين H_2O_2 ولدراسة ذلك الأمر تم تحويل البطاطس وراثيًا بجين الفطر *Aspergillus niger* الذى يشفر لتمثيل الإنزيم glucose oxidase، الذى يعمل على إنتاج فوق أكسيد الأيدروجين عندما يتأكسد الجلوكوز. أدت عملية التحول الوراثى تلك إلى زيادة مستويات فوق أكسيد الأيدروجين فى كل من الأوراق والدرنات، وأظهرت النباتات المحولة وراثيًا مقاومة قوية ضد بكتيريا العفن البكتيرى الطرى الذى تسببه البكتيريا *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*،

واستمرت حالة المقاومة فى كل من الظروف الهوائية واللاهوائية. ويبدو أن تلك المقاومة كان مردها إلى المستويات العالية التى تكونت من فوق أكسيد الأيدروجين، نظرًا لأنها - أى المقاومة - اختفت لدى معاملة الأنسجة المحولة وراثيًّا والمحقونة بالبكتيريا بإنزيم محلل لفوق أكسيد الأيدروجين H_2O_2 degrading catalase كذلك أظهرت النباتات المحولة وراثيًّا مقاومة جيدة ضد الفطر *Phytophthora infestans* المسبب للندوة المتأخرة، حيث تأخر ظهور البقع المميزة للإصابة بهذا الفطر (Wu وآخرون ١٩٩٥)

كذلك أظهرت نباتات البطاطس التى حولت وراثيًّا بهذا الجين مقاومة عالية لعدد آخر من الأمراض الفطرية والبكتيرية، وخاصة لمرض ذبول فيرتسيلليم. كما أظهرت نباتات الأرز التى حولت وراثيًّا بجين فوق أكسيد الأيدروجين مقاومة للفطريات (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الجينات المستعملة فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة البكتيريا

لم تلق جهود الهندسة الوراثية لأجل مقاومة الأمراض البكتيرية نجاحًا كبيرًا، ومن الأمثلة القليلة الواعدة فى هذا الشأن، ما يلى:

جينات المقاومة الطبيعية

قد تكون الجينات المتحصل عليها من النباتات الراقية - لأجل عمليات التحول الوراثى لمقاومة الأمراض البكتيرية - من جينات المقاومة الطبيعية للمرض ذاته أو لأمراض أخرى فى النباتات التى حُصِّل منها على تلك الجينات، ومن الأمثلة على ذلك، ما يلى

- من بين جينات المقاومة الطبيعية التى تكثر الدراسات عليها حاليًّا فى مجال هندسة المقاومة للأمراض البكتيرية الجين Rps2 من *Arabidopsis*، وجينا الطماطم Cf9، و Pto (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

- أمكن عزل طفرة من النبات الموديل *Arabidopsis thaliana* تؤدى إلى وقف ظهور أعراض الإصابة بالذبول بعد حقن النبات بسلالة عالية الضراوة من البكتيريا

Ralstonia solanacearum. أعطى هذا الجين الرمز nws1 (حيث لا توجد أعراض ذبول no wilt symptoms). ولم يكن لغياب أعراض الذبول ارتباطًا مع أى موت لخلايا العائل، أو لأى تعبير معين لجينات حامض السلسليك salicylic acid أو حامض الجاسمونيك jasmonic acid، أو تلك المتعلقة بالإثيلين. كما كانت هذه الطفرة خاصة – فقط – بتلك البكتيريا (Feng وآخرون ٢٠٠٤).

• وتتطلب مقاومة الطماطم للبكتيريا *Pseudomonas syringae* pv *tomato* الجينين Pto، و Prf. وفى الطفرات التى يختفى فيها الجين Prf تُفقَد المقاومة للـ Pto، والحساسية للمبيد الحشرى العضوى الفوسفورى فِنثيون fenthion؛ بما يفيد تحكم الجين Prf فى كلا الشكلين المظهريين. ولقد وجد أن زيادة التعبير عن الجين Prf تؤدى إلى زيادة المقاومة لعدد من المسببات المرضية البكتيرية والفيروسية وزيادة الحساسية للفنثيون، كما تُظهر تلك النباتات مستويات من حامض السلسليك تقارن بما تظهره النباتات التى تحدث بها حالات المقاومة الجهازية المكتسبة ويستفاد من تلك الدراسة أن زيادة التعبير عن Prf يُنَشِّط المسارات الأيضية لكل من الـ Pto والـ Fen بطريقة مستقلة عن المسبب المرضى، وتؤدى إلى تنشيط المقاومة الجهازية المكتسبة (Oldroyd & Staskawicz ١٩٩٨).

• أمكن تحويل الأرز وراثيًا بالجين Xa21 – الذى يكسبه مقاومة ضد البكتيريا *Xanthomonas oryzae* – بنقله إليه من النوع *Oryza longistaminata*، الأمر الذى لم يمكن تحقيقه بطرق التربية التقليدية.

هذا . إلاّ أنه عندما نقل جين الفلفل Bs2 – المسئول عن مقاومته للبكتيريا *Xanthomonas* – إلى أنواع من غير الباذنجانيات فإنه لم يكن فعّالاً، بما يعنى أن جينات المقاومة R genes قد تقتصر فاعليتها على الأنواع المتقاربة تقسيميًا فقط (عن Dickinson ٢٠٠٣)

التعبير عن جينات البكتيروفاجات

أدى التعبير عن الـ bacteriophage T4 lysozyme فى البطاطس المحولة وراثيًا إلى زيادة مقاومتها للبكيريا *Erwinia carotovora*

وتجدر الإشارة إلى أن الليزوزيمات تعد من البروتينات ذات النشاط المضاد للبكتيريا

الجينات التى تشفر لبروتينات مضادة للبكتيريا

يمكن الاستفادة من الجينات التى تشفر لبروتينات ذات نشاط مضاد للبكتيريا، وهى التى تعرف باسم lytic proteins، مثل: السركوبينات cercopins، والأتاسينات attacins، والليزوزيمات lysozymes (التى أسلفنا الإشارة إليها).

وعلى سبيل المثال أمكن تحويل البطاطس وراثيًا بالجين cercopin B، وكانت النباتات الناتجة أكثر تحملاً للسلالة ٣ من البكتيريا *Ralstonia solanacearum* عن النباتات غير المحولة وراثيًا

كذلك فإن الجينات التى تشفر لتكوين البولى ببتيدات الصغيرة مثل الثيونينات thionins – وهى التى تؤدى إلى تدهور الأغشية الخلوية فى الكائنات الدقيقة – تفيد فى عمليات التحول الوراثى وقد وجد أن التعبير عن جين الشعير α-thionin فى التبغ المحول وراثيًا يزيد بشدة من مقاومته للبكتيريا *Pseudomonas syringae*، إلا أن محاولات أخرى مع هذا البروتين لم تُحسن من صفة المقاومة (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

هذا وتتركب الجدر الخلوية للبكتيريا مما يعرف باسم peptidoglycans، وهى تتكون من بروتين ومكونات كربوهيدراتية يمكن هضمها بالإنزيم ليزوزيم lysozyme، الذى يوجد بوفرة فى بيض الدجاج يتواجد هذا الإنزيم – كذلك – فى معدة الماشية حيث يلعب دورا فى تحليل البكتيريا التى تتكاثر هناك لأنها تساعد فى تحليل السليلوز والمكونات الأخرى للجدر الخلوية النباتية ومن الممكن استعمال إنزيم الماشية هذا المُحلِّل للجدر الخلوية للبكتيريا فى عمليات التحول الوراثى للنباتات. ولقد أمكن –

بالفعل – نقل هذا الجين إلى الخميرة *Pichia pastoris* التى أصبحت قادرة على إنتاج كميات ضخمة من إنزيم الليزوزيم ولدى استعمال هذا الإنزيم فى معاملة بذور النباتات بتركيز ٢٥–١٠٠ جزء فى المليون فإنه أدى إلى قتل ما على تلك البذور من بكتيريا.

هذا . إلاّ إنه من مخاطر استعمال إنزيم الليزوزيم فى عمليات التحول الوراثى ثباته الشديد، الأمر الذى قد يؤدى إلى قتله للبكتيريا النافعة فى التربة؛ ولذا .. يتعين التأكد من مدة بقاء الإنزيم فى التربة بعد زراعة نباتات محولة وراثيًا به، وما هى تأثيراته على بكتيريا التربة (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

ولقد أمكن تحويل البطاطس وراثيًا بجين الدجاج chly المسئول عن تكوين الإنزيم lysozyme (وهو إنزيم يحلل الشيتين والببتى دوجليكان petidoglycan)، وقد أظهرت النباتات المحولة وراثيًا مقاومة للإصابة بالبكتيريا *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* المسببة لمرض العفن الأسود لقاعدة الساق والعفن الطرى. وقد ارتبط مستوى المقاومة بمستوى التعبير عن الجين chly فى النباتات المحولة وراثيًا (Serrano وآخرون ٢٠٠٠).

الجينات التى تشفر لتكوين مركبات مضادة للبكتيريا

من بين محاولات التحول الوراثى التى أجريت بهدف التشفير لتكوين مركبات مضادة للبكتيريا، ما يلى:

- تم تحويل البطاطس وراثيًا بالجين المنتج للبروتين sarcotoxin IA (وهو سُم بكتيرى) المتحصل عليه من *Sarcophaga peregrina*. وذلك لجعلها أكثر تحملاً للإصابة للأعفان التى تسببها كلا من *Erwinia* spp.، و *Ralstonia solanacearum* (Galun وآخرون ١٩٩٧)

- أمكن تخليق جين فى المختبر - يتميز بنشاطه الواسع المدى المضاد للكائنات الدقيقة – أعطى الرمز MsrA1، وهو يشفر لتكوين المركب: N terminus-modified, cecropin-melittin cationic peptide chimera ذات الفاعلية الواسعة المدى ضد

الكائنات الدقيقة وقد تم نقل هذا الجين المخلق إلى البطاطس، التى لم يتأثر مظهرها أو محصولها من الدرنات، بينما كانت شديدة المقاومة للمسببات المرضية التى حقنت بها البطاطس، وهى: *Phytophthora cactorum*، و *Fusarium solani*، و *Erwinia carotovora* ولقد احتفظت الدرنات المحولة وراثيًا بقدرتها على المقاومة لأكثر من عام، ولم تظهر أى أضرار على الفئران التى غذيت عليها (Osusky وآخرون ٢٠٠٠)

○ أمكن تحويل البطاطس وراثيًا بجين تم تحضيره من جينى الديفينسين cecropin من الفراشة giant silkmoth، والـ melittin من نحل العسل، وباختبارها تبين مقاومتها للبكتيريا *Erwinia carotovora* المسببة للعفن الطرى البكتيرى

○ تُجرى محاولات تأخذ اتجاهات شتى فى محاولة لتحويل التفاح والكمثرى وراثيًا بأنواع مختلفة من البروتينات المضادة للميكروبات لأجل مقاومتها للبكتيريا *Erwinia amylovora* المسببة للفحة ولقد نجح تحويل التفاح وراثيًا بجين الـ attacin E فى جعله أكثر مقاومة للبكتيريا تحت ظروف الحقل (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

○ أمكن زيادة المقاومة فى كل من التبغ والكرنب بتحويلهما وراثيًا بجين glucose oxidase الذى حُصل عليه من *Aspergillus niger*، وكانت حالات المقاومة التى اختبرت هى ضد كل من *Phytophthora nicotianae* فى التبغ، و *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* فى الكرنب (Lee وآخرون ٢٠٠٢)

○ يؤدى المركب المعروف باسم tachyplesin I [وهو ببتيد مضاد للميكروبات يُنتجه سلطعون حدوة الحصان الآسيوى *Tachypleus tridentatus* (أحد أنواع سرطانات البحر)] .. يؤدى بتركيز ٤,١- ١١,١ ميكروجرام/مل فى البيئات الصناعية إلى قتل البكتيريا *Erwinia* spp. المسئولة عن إصابة البطاطس بكل من العفن الطرى وعفن قاعدة الساق الأسود وعندما حولت البطاطس وراثيًا بالجين الذى يشفر لهذا المركب كانت الدرنات أقل إصابة قليلاً ببكتيريا العفن الطرى *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Allefs وآخرون ١٩٩٦)

○ يتميز جليكوبروتين الثدييات: lactoferrin (الذى يأخذ الرمز Lf) بخاصيتى قتل

البكتيريا bactericidal ووقف نشاطها bacteristatic، وذلك بالنسبة لمدى واسع منها، وكذلك تأثيره على الفطريات والفيروسات، حيث يتراوح التركيز القاتل منه بين ٣، و ١٥٠ ميكروجرام/مل بالنسبة للبكتيريا، و ١٨–١٥٠ ميكروجرام/مل بالنسبة للخميرة، و ٣–٦٠ ميكروجرام/مل بالنسبة للفطريات الخيطية (عن Zhang ١٩٩٨)

وقد أمكن تحويل التبغ وراثيًا بالجين المسئول عن تكوين الـ lactoferrin الإنساني، حيث أظهرت النباتات التى عُبِّرَ فيها عن هذا الجين تأخيرا جوهريًا فى ظهور أعراض الإصابة بالذبول عندما تم عدواها بالبكتيريا *Ralstonia solanacearum*، وكانت العلاقة طردية بين شدة التعبير عن الجين وشدة المقاومة للبكتيريا (Zhang وآخرون ١٩٩٨).

الجينات التى تشفر لتكوين إنزيمات تلغى التأثير السام للسموم البكتيرية

إن عديدًا من الأنواع البكتيرية والفطرية المرضة للنباتات تقوم بزيادة قدرتها على الإصابة (زيادة درجة ضراوتها virulence) بإنتاجها لسموم متخصصة على عوائل معينة أو غير متخصصة ونظرًا لأن المسببات المرضية تكون مقاومة للسموم التى تنتجها، فإن الأعراض المرضية التى تُحدثها بعض تلك المسببات يمكن الحد منها بنقل جينات المسببات المرضية – التى تتحكم فى إنتاج تلك السموم – إلى النباتات. ومن الأمثلة الهامة على المقاومة – المتحصل عليها من المسبب المرضى – للأمراض التى تظهر أعراضها من خلال السموم التى تفرزها المسببات المرضية – حالة اللفحة الهالية فى الفاصوليا التى تسببها البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

إن الاصفرار الشديد الذى يظهر على النباتات التى تُصاب بهذه البكتيريا يحدث بفعل السم phaseolotoxin (وهو ثلاثى الببتيد tripeptide) الذى تفرزه البكتيريا. يثبط هذا السم الإنزيم ornithine carbamoyltransferase (اختصارًا OCTase) الذى يقوم بتحويل كل من الـ ornithine والـ carbomyl phosphate إلى citrulline، وهو تفاعل يدخل فى تمثيل الـ arginine وفى التحولات بين الأحماض الأمينية من عائلة الـ

glutamate يثبط الـ phaseolotoxin – كذلك – نمو عديد من الأنواع البكتيرية نظرًا لاحتوائها – أيضًا – على OCTase.

تنتج البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* طرازين من الـ OCTase، أحدهما حساس للـ phaseolotoxin، والآخر مقاوم له. وأثناء النمو فى الجو البارد نسبيًا – عندما يكون إنتاج الـ phaseolotoxin مثاليًا -- تنتج هذه البكتيريا الـ OCTase المقاوم فقط، ومن ثم تكون البكتيريا مقاومة للسم الذى تفرزه. ولقد عزل الجين المسئول عن إنتاج الـ OCTase البكتيرى غير الحساس ونقله إلى النباتات، التى أصبحت قادرة على إنتاج هذا الـ OCTase غير الحساس للـ phaseolotoxin، بالإضافة إلى الـ OCTase الأصلى الذى يعد حساسًا لهذا السم. هذا إلاّ أن وجود الـ OCTase غير الحساس فى النباتات يجعلها قادرة على التغلب على التثبيطات الإنزيمية التى يمكن أن تحدث عندما تنتج البكتيريا السم داخل النبات، ومن ثم تكون هذه النباتات أقل حساسية للسم وأقل إظهارًا لأعراض المرض (عن Lindow ١٩٩٦).

ويشفر جين الطماطم Pto لإنزيم من الـ serine-threonine kinase، الذى يكسب النباتات مقاومة لسلالات البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* التى يُعَبَّرُ فيها عن جين عدم الضراوة avirulence gene الذى يأخذ الرمز avrPto. ولقد تبين أن سلالة التبغ Wisconsin-38 يظهر عليها حالة فرط حساسية hypersensitivity لدى حقنها (عدواها) بالبكتيريا *P. syringae* pv. *tabaci* التى يُعبَّرُ فيها عن الجين avrPto. وعندما حولت سلاله التبغ Wisconsin-38 وراثيًا بالجين Pto أظهرت النباتات زيادة معنوية فى المقاومة للبكتيريا، مقارنة بمقاومة السلالة الأصلية غير المحولة وراثيًا (Thilmony وآخرون ١٩٩٥). ولقد حدث الأمر ذاته عندما حولت نباتات *Nicotiana benthamiana* بنفس الجين Pto (Rommens وآخرون ١٩٩٥)، مما يعنى أن جينات المقاومة تحافظ على خصائصها وتأثيراتها المسئولة عن صفة المقاومة المتخصصة حتى عند نقلها من جنس لآخر.

كذلك أمكن تحويل التبغ وراثيًا بالجين ttr الخاص بتنظيم المقاومة للـ tabtoxin فى

Pseudomonas syringae pv. *tabaci*، حيث أظهرت النباتات المحولة وراثيًا مقاومة لكل من المعاملة بالسم البكتيرى وللإصابة بالبكتيريا. ومن الطبيعى أن هذه الاستراتيجية فى الهندسة الوراثية لا تفيد إلاّ مع الأمراض التى تلعب فيها السموم دورًا مباشرًا وأساسيًا فى ظهور المرض (عن Nascari & Montanelli ١٩٩٧).

الاستراتيجيات الأخرى لهندسة نباتات مقاومة للأمراض

من بين الاستراتيجيات التى يفكر فيها علماء الهندسة الوراثية لإنتاج نباتات مقاومة لمسببات الأمراض، ما يلى:

١ - تجريد المسببات المرضية - التى تحدث أضرارها من خلال إفرازها لإنزيمات تقوم بتحليل الجدر الخلوية - تجريدها من أسلحتها، ليس بوقف إنتاج تلك الإنزيمات - فهى كثيرة - وإنما بالحد من مفعولها بتعديل النباتات بجينات تؤثر فى انتقال تلك الإنزيمات فى النباتات، وهى التى ينظم انتقالها جينات مثل Aep (وهو رمز لوظيفة الجين activation of extracellular enzyme production)، فإذا أمكن تحديد ونقل جين يحد من نشاط الجين Aep activator لأمكن الحد من انتقال إنزيمات بعينها، كتلك التى تعمل على تحلل الجدر الخلوية.

٢ - نقل الجينات التى تجعل النباتات أقل عرضة للتجريح، أو تزيد من سرعة الاستجابة للتجريح، أو تزيد من سرعة تكوين بيريدرم الجروح.

٣ - إبطاء النضج بحيث لا تفقد الثمار صلابتها سريعا بعد الحصاد، ومن ثم تستمر أقل عرضة للإصابة بالأعفان لأطول فترة ممكنة بعد الحصاد. وقد تناولنا هذا الموضوع بالشرح فى موضع آخر من هذا الكتاب (Mount & Berman ١٩٩٤).

الإنجازات فى مجال التحول الوراثى لمقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية

على الرغم من حداثة العهد نسبيًا فى مجال دراسات التحول الوراثى لإنتاج نباتات مقاومة للفطريات والبكتيريا الممرضة للنباتات، فقد تم إنتاج واختبار عديد من حالات التحول الوراثى فى عدد من أهم المحاصيل الزراعية، بهدف جعلها مقاومة لعدد من أهم المسببات المرضية (جدولا ١٦-٢، و ١٦-٣).

جدول (١٦-٢): حالات التحول الوراثى لمقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية التى تم اختبارها حقليًا فى الولايات المتحدة حتى عام ١٩٩٨ (عن Chopra ١٩٩٩)

المحصول	المسبب المرضى الذى يقاومه الجين	الجين	مصدر الجين
التفاح	*Erwinia amylovora*	Attacin	*Hyalophora cecropia*
	E. amylovora	Lysozyme	الدجاج
	E. amylovora	Cecropin B	*H. cecropia*
الخيار	*Phytophthora*	Glucanase	التبغ
	Phytophthora	Osmotin	التبغ
	Phytophthora & Verticillium	Chitinase	التبغ
الخس	Downy mildew	Osmotin	التبغ
	Downy mildew	Chitinase	التبغ
	Downy mildew	Glucanase	التبغ
الكنتالوب	*Phytophthora*	Chitinase	التبغ
	Phytophthora	Glucanase	التبغ
	Phytophthora	Osmotin	التبغ
البطاطس	*Rhizoctonia solani*	Glucanase	التبغ
	R. solani	Chitinase	*Serratia marcescens*
	R. solani	Glucanase	التبغ
	Verticillium	DRRG 49	البسلة
	Corynebacterium sepedonicum	Cecropin B	*H. cecropia*
	E. carotovora	Cecropin B	*H. cecropia*
	Soft rot and Ring rot	Lysozyme	الدجاج
	Streptomyces scabies	Cecropin B	*H. cecropia*
	Soft rot	Glucanase	التبغ
الكوسة	Mildew	Osmotin	التبغ
	Mildew	Chitinase	التبغ
	Mildew	Glucanase	التبغ
التبغ	*Phoma*	Glucanase	البرسيم الحجازى
	Phoma	Chitinase	الأرز
	Rhizoctonia, Thelaviopsis	Chitinase	*S. marcescens*
	Botrytis cinerea	Stilbene synthase	العنب
	Rhizoctonia, Phytophthora	Glucanase	التبغ
الطماطم	Fungal post-harvest	Chitinase	*S. marcescens*
	Crown rut	Chitinase	*S. marcescens*
	Soft rot fungus	Polygalacturonase inhibitor	الكمثرى
	Powdery mildew	Chitinase	*S. marcescens*
	Botrytis	Chitinase	*S. marcescens*
	Alternaria solani	Chitinase	التبغ

جدول (١٦-٣): النباتات المحولة وراثيًا التى أنتجت من مختلف المحاصيل الزراعية لمقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية حتى عام ١٩٩٩ (عن Chawala ٢٠٠٠).

طبيعة المقاومة والمحصول	الجين	المسبب المرضى الذى يقاومه الجين
بروتينات:		
التبغ	Bacterial chitinase from *serratia marcescens*	*Altermaria longipes*
	Bean chitinase gene	*Rhizoctonia solani*
	PR-1-a gene	*Peronospora tabacina, Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*
	Chitinase	*Sclerotinia sclerotiorum*
	Chitinase	*Rhizoctania solani*
	Chitinase and 1,3-β glucanase	*Cercospora nicotinae*
الطماطم	Chitinase and 1,3-β glucanase	*Fusarium oxysporum lycopersici*
Brassica napus	Chitinase	*Rhizoctonia solani*
Brassica napus var. oleifera	Chitinase	*Cylindrosporium concentricum; Phoma lingam; Sclerotinia scleratiorum*
الأرز	Chitinase	*Rhizoctonia solani*
الجزر	Chitinase and 1,3-β glucanase	*Alternaria douci, Alternaria radicina, Cercospora carotae, Erysiphe heraclei*
البطاطس	PR5	*Phytophthora infestans*
مضادات ميكروبية بروتينية:		
التبغ	Barley RIP (ribosome inactivating protein)	*Rhizoctonia solani*
الطماطم	Prohevein from *Hevca brassiliensis*	*Trichoderma hamotum*
التبغ	Defensin-Rs AFP_2 from radish	*Alternaria longipes*
التبغ	Barley α thionin geme	*Pseudomonas syringae* pv *tabaci, P. syringae* pv *syringae*
التبغ	Cecropin	*P. syringae* pv *tabaci*
الأرز	Cecropin	Bacterial pathogen
البطاطس	Bacteriohage T-4 lysozyme	*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptia*
التبغ	Hen egg white lysozyme (HEWL)	*Botrytis cinerca, Verticillium nlboatrum, Rhizactonia solanum*

تابع جدول (١٦-٣).

طبيعة المقاومة والمحصول	الجين	المسبب المرضى الذى يقاومه الجين
التبغ	Lysozyme from human being	*Pseudomonas syringae* pv *tabaci*; *Erysiphe cichoracearum*
البطاطس	H_2O_2 gene for glucose oxidase	*Verticillium dahlea*, *Phytophthora*; *Erwinia carotovora*
فيتو ألاكسينات:		
التبغ	Stilbene synthase	*Botrytis cinerea*
Brassica napus	Stilbene synthase	--
الأرز	Stilbene synthase	*Pyricularia oryzae*

الفصل السابع عشر

الهندسة الوراثية لتحمل الظروف البيئية القاسية

يتطلب إجراء عمليات التحول الوراثى بهدف تحمل الظروف البيئية القاسية (أى بهدف تحمل عوامل الشدّ البيئى) فهمًا دقيقًا لطبيعة ذلك التحمل، علمًا بأن مختلف عوامل الشدّ البيئى – مثل: الملوحة العالية، والحرارة المنخفضة، والتجمد، والجفاف – تشترك جميعها فى كونها تتضمن شدًا مائيًا، على الرغم من أن تفاصيل الأضرار التى تحدث للنباتات من جراء تعرضها لأى من حالات الشدّ تختلف اختلافًا بيّنًا من حالة لأخرى، وتختلف معها – بالتالى – طبيعة تلك الأضرار، والاستراتيجيات المحتملة للوقاية منها. ولهذه الأسباب مجتمعة فإن من استراتيجيات الهندسة الوراثية لتحمل الظروف البيئية القاسية ما هو ذات طبيعة عامة تشمل كل حالات الشدّ البيئى، ومنها ما يوجه لحالات شدٍ خاصة دون غيرها.

التحول الوراثى لتحمل أكثر من واحد من عوامل الشدّ البيئى

الاعتماد على جين الجليسين بيتين

يُنتج الجليسين بيتين glycine betaine (وهو مركب رباعى الأمونيوم quaternary ammonium compound) بواسطة أكثر من عشرة عائلات نباتية مزهرة، بالإضافة إلى الطحالب البحرية وبعض الأنواع البكتيرية. يقوم الجليسين بيتين بالمحافظة على كيان البروتينات والأغشية الخلوية (منعها من التدهور)، كما يقوم بحماية الخلايا مما قد يحيط بها من ضغوط أسموزية عالية بتوفير ضغط أسموزى مقابل داخل الخلايا، أى إنه يعمل كـ osmolyte. ولقد دُرست عملية تمثيل الجليسين بيتين فى النباتات – فقط – فى أنواع من العائلة الرمرامية، مثل: السبانخ والبنجر وغيرهما.

هذا . ويتباين مسار تمثيل الجليسين بيتين فى كل من النباتات، والبكتيريا *Escherichia coli*، والبكتيريا *Arthobacter globiformis* (شكل ١٧-١).

$H_3C\text{-}N^+(CH_3)_2\text{-}CH_2CH_2\text{-}O$ — O_2, $2H_2O$, $2Fdx_{red}$, $2Fdx_{ox}$, CMO → betaine aldehyde — NAD^+, $NADH + H^+$, BADH → glycine betaine

choline betaine aldehyde glycine betaine

1 Plants

choline — NAD^+, $NADH + H^+$, CDH → betaine aldehyde — NAD^+, $NADH + H^+$, BADH → glycine betaine

choline betaine aldehyde glycine betaine

2 *E coli*

choline — $O_2 + 2H_2O$, $2H_2O_2$, COD → glycine betaine

choline glycine betaine

3. *Arthrobacter globiformis*

شكل (١٧-١): مسارات تمثيل الجليسين بيتين glycine betaine فى كل من النباتات، والنوعين البكتيريين *Escherichia coli*، و *Arthobacter globiformis* (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

ولقد جرت محاولات للتحكم فى إنتاج الجليسين بيتين بإجراء التحولات الوراثية المناسبة بأى من جينات النباتات، أو *E. coli*، أو *A globiformis* (جدول ١٧-١) ولقد أدى التحول الوراثى للنباتات بجينات الـ betaine aldehyde dehydrogenase من أى من النباتات أو *E coli* .. أدى إلى تراكم الجليسين بيتين فى النباتات عندما زودت تلك النباتات بالبيتين ألدهيد betaine aldehyde، لكن ذلك التراكم لم يحدث فى النباتات المحولة وراثيًا فى غياب البيتين ألدهيد

جدول (١٧-١): تراكم الجليسين بيتين glycine betaine فى النباتات المحولة وراثيًا وتحملها لحالات الشدّ البيئى.

جين التحول الوراثى	النباتات المحولة وراثيًا	تراكم الجليسين بيتين	حالة تحمل الشدّ البيئى
Barley *badh* (betaine aldehyde dehydrogenase)	Tobacco peroxisome	لم يختبر	لم يختبر
Spinach *badh*	Tobacco chloroplast	20 µmol g^{-1} FW (in 5 mmol l^{-1} betaine aldehyde)	لم يختبر
Spinach *cmo* (choline monooxygenase)	Tobacco chloroplast	<0.05 µmol g^{-1} FW	لم يختبر
E. coli betB (betaine aldehyde dehydrogenase)	Tobacco chloroplast or cytosol	Not tested	لم يختبر
E. coli. BetA (choline dehydrogenase)	Tobacco cytosol (membranes)	Not detected	اللوحة
betA/betB	Tobacco	0.035 µmol g^{-1} FW	البرودة اللوحة
betA	Rice	5.0 µmol g^{-1} FW	الجفاف اللوحة
A. globiformis codA (choline oxidase)	*Arabidopsis chloroplast*	1.2 µmol g^{-1} FW	اللوحة البرودة التجمد الحرارة الضوء القوى
codA	Rice	5.3 µmol g^{-1} FW	اللوحة البرودة
A. pascens cox (choline oxidase)	*Arabidopsis*	19 µmol g^{-1} DW	التجمد اللوحة
cox	*Brossica napus*	13 µmol g^{-1} DW	الجفاف اللوحة
cox	Tobacco	13 µmol g^{-1} DW	اللوحة

FW : وزن طازج، و DW : وزن جاف.

وفى عدد من الحالات التى حدث فيها تراكم للجليسين بيتين أظهرت النباتات التى حُوِّلت وراثيًّا قدرة على تحمل شدّ النقص المائى، بما فى ذلك تحمل الملوحة،

والبرودة، والتجمد، والجفاف (جدول ١٧-١)، بما يعنى أن هذا المركب "الواقى من الضغط الأسموزى العالى" osmoprotectant - وربما غيره كذلك - يحفز القدرة على تحمل حالات الشدّ التى يحدث بسببها نقص مائى. هذا . إلاّ إنه لا يعرف وجه التحديد الدور الذى يلعبه الجليسين بيتين، خاصة وأن تراكمه فى النباتات المحولة وراثيًا لا يزيد عن ١٠٪ من مستوى التراكم الذى يحدث فى النباتات التى يتواجد فيها المركب بصورة طبيعية، مثل السبانخ، ولا يصل مستواه فى حالات التحول الوراثى إلى المستوى الذى يمكن أن يُسهم به كمنظم أسموزى فى حالات تحمل الشدّ الأسموزى المشاهد (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الاعتماد على جينات لـ "واقيات أسموزية" أخرى

استعملت فى عمليات التحول الوراثى جينات لواقيات أسموزية osmoprotectants كثيرة أخرى غير تلك المتحكمة فى إنتاج الجليسين بيتين، ومنها الجينات التى تتحكم فى إنتاج كل من البرولين proline، والمانيتول mannitol، والسوربيتول sorbitol، والتريهالوز trehalose، والـ دى-أونونيتول D-ononitol، والفروكتانات fructans، والجلوتامين glutamine، والأزموتين osmotin ونقدم فى جدول (١٧-٢) قائمة بمحاولات استعمال الجينات المتحكمة فى إنتاج تلك المركبات فى عمليات التحول الوراثى وتأثيرها على تحمل مختلف عوامل الشدّ البيئى (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

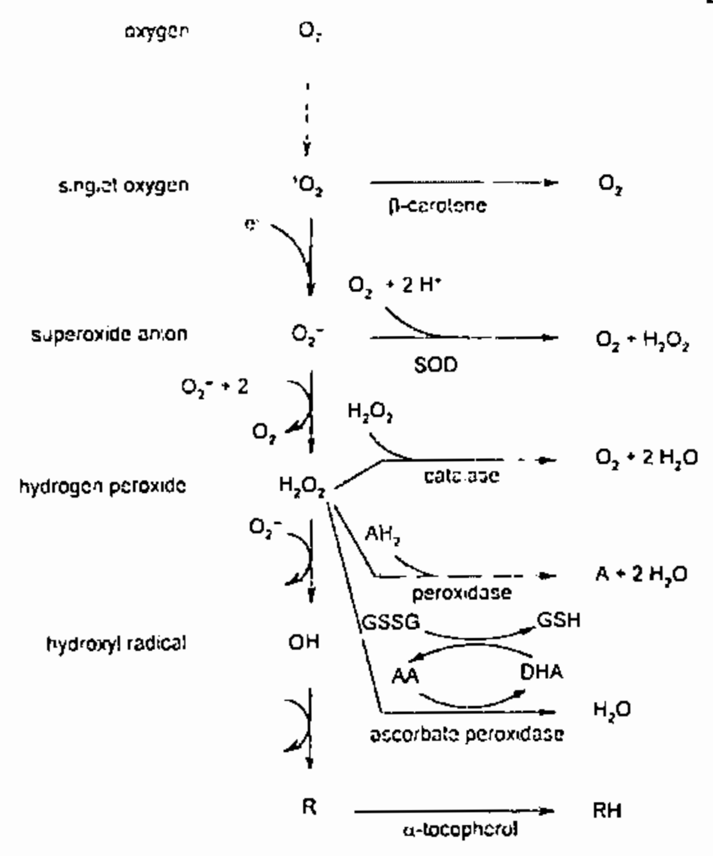
الاعتماد على الجينات المتحكمة فى إنتاج مضادات الأكسدة

يترتب على غالبية حالات الشدّ (غير البيولوجى والبيولوجى) شدًا تأكسديًا oxidative stress، وعلى الرغم من أن الشد التأكسدى يحدث بصورة مباشرة من جراء التلوث بالأوزون أو الأشعة المؤينة، إلاّ أنه يحدث - غالبًا - كأثر ثانوى لأنواع كثيرة من الشدّ تتراوح ما بين الإصابة بالكائنات المرضة إلى العوامل المحدثة لشدّ النقص المائى وينشأ الشدّ التأكسدى نتيجة لإنتاج free radicals، وما يعقب ذلك من حدوث لسلسلة من التفاعلات الضارة.

جدول (١٧-٢): أمثلة لحالات تحول وراثى بجينات تتحكم فى إنتاج عدد من الواقيات الأسموزية osmoprotectants (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الواقى الأسموزى osmoprotectant	الجينات المستعملة فى التحول الوراثى	النباتات المحولة وراثيًا	تراكم الواقى الأسموزى	حالة تحمل الشد البيئى
Proline	Mothbean *P5CS* (Pyrroline carboxylate Synthetase)	التبغ		الملوحة
		الأرز		الجفاف والملوحة
		فول الصويا		الملوحة والحرارة
	P5CS (feedback inhibition) Insensitive)	التبغ	4 mg g^{-1} FW	الملوحة
	Anti-ProDH (proline dehydrogenase)	*Arabidopsis*	0.6 mg g^{-1} FW	الملوحة والتجمد
Mannitol	*E. coli mtlD* (mannitol-1-phosphate dehydrogenase)	*Arabidopsis*	10 µg g^{-1} FW	الملوحة
		التبغ	6 µmol g^{-1} FW	الملوحة
Sorbitol	Apple *s6pdh* (sorbitol-6-phosphate) dehydrogenase)	التبغ		شد التأكسد
		البرسيمون	61.5 µmol g^{-1} FW	الملوحة
Trehalose	Yeast *tps1* (trehalose-6-phosphate synthase, T-6-PS)	التبغ	3.2 µg g^{-1} DW	الجفاف
		البطاطس		الجفاف
	E. coli otsA + otsB (T-6-PS and T-6-P Phosphatase)	التبغ	90 µg g^{-1} FW	الجفاف
D-Ononitol	Ice plant *imt1* (Myo-inositol o-methyltransferase)	التبغ	35 µmol g^{-1} FW	الجفاف والملوحة
Fructans	*B. subtilis sacB*	التبغ	0.35 mg g^{-1} FW	الجفاف
		بنجر السكر	5 mg g^{-1} DW	الجفاف
Glutamine	GS2 (chloroplastic glutamine synthetase)	الأرز		الملوحة والبرودة
Osmotin	*Osm1-Osm4* (protein accumulation)	التبغ		الجفاف والملوحة

تحتوى النباتات على عدد من الإنزيمات التى يمكنها تحويل المركبات ذات القابلية الشديدة للتأكسد إلى مركبات أخرى أقل قابلية (شكل ١٧-٢). ومن أهم الإنزيمات فى هذا الشأن كلاً من: الـ superoxide dismutase، والـ catalase، والـ peroxidases كما يوجد - أيضًا - كما يظهر فى شكل (١٧-٢) _ مركبات مضادة للأكسدة antioxidants تتفاعل مع المركبات النشطة فى الأكسدة؛ لتحولها إلى مركبات غير ضارة. ومن أهم تلك المركبات ثلاثة فيتامينات، هى البيتا كاروتين β-carotene (بادئ فيتامين أ)، وحامض الأسكوربيك ascorbic acid (فيتامين جـ)، والألفا توكوفيرول α-tocopherol (فيتامين هـ) ومن مضادات الأكسدة الهامة الأخرى الجلوتاثايون glutathione، والزيازانثين zeaxanthin



شكل (١٧-٢): تمثيل المركبات النشطة فى الأكسدة، والإنزيمات التى تعمل على التخلص منها، وكذلك تمثيل مضادات الأكسدة الهامة (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

ولقد وجد أنه يمكن الحد من أضرار الشدّ التأكسدى بإحدى استراتيجيتين، هما: إما بزيادة مستوى الإنزيمات التى تعمل على التخلص من المركبات النشطة فى الأكسدة، وإما بزيادة مستوى مضادات الأكسدة التى تتفاعل مع المركبات النشطة فى الأكسدة.

ولقد أمكن إجراء عمليات تحول وراثى بثلاثة من الإنزيمات التى ظهرت فى شكل (١٧-٢)، وهى ascorbate peroxidase، و glutathione peroxidase، و glutathione reductase، حيث نقلت إلى الـ *Arabidopsis* والتبغ (جدول ١٧-٣)؛ مما أدى إلى زيادة قدرتها على تحمل مختلف حالات الشدّ غير البيولوجى، مثل: الحرارة العالية، والبرودة، والملوحة، كما وفر الـ glutathione reductase - كذلك - مقاومة للشدّ التأكسدى الناتج من المعاملة بالباراكوات paraquat (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

هذا ويجمع جدول (١٧-٤) بين مجموعة من الجينات التى استعملت فى عمليات التحول الوراثى لأجل تحمل مختلف حالات الشد البيئى (عن Chawla ٢٠٠٠).

التحول الوراثى لتحمل حالات خاصة من الشدّ البيئى

تحمل الملوحة العالية

من بين عمليات التحول الوراثى التى أجريت لأجل زيادة القدرة على تحمل الملوحة، ما يلى:

• أنتجت نباتات تبغ محولة وراثيًّا لتحمل الملوحة ولذلك بالجينmtlD، الذى حُصِلَ عليه من البكتيريا *Escherichia coli*، والذى يجعل النباتات تنتج كميات محسوسة من المانيتول mannitol، وتبين أن النباتات التى حولت وراثيًّا بهذا الجين كانت أكثر تحملاً للملوحة عن قريناتها غير المحولة (عن Pharr وآخرين ١٩٩٥).

• أمكن تحويل السيانوبكتيريا: *Synechococcus* sp. وراثيًّا بالجين codA المسئول عن تمثيل الإنزيم choline oxidase المنقول من النوع البكتيرى الذى يعيش فى التربة *Arthrobacter globiformis*. وقد تراكم الـ glycinebetaine فى البكتيريا التى حولت وراثيًّا، وأصبحت أكثر تحملاً للملوحة (Murata وآخرون ١٩٩٦).

جدول (١٧-٣). الجينات التي استعملت في عمليات التحول الوراثي لتحمل الشدّ التأكسدي (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

حالة التحمل للشدّ البيئي	النبات المحول وراثيًا	الجين
2X increase in SOD. Increased field drought tolerance. Increased freezing tolerance	Alfalfa chloroplast	Mitochondrial Mn-SOD Tobacco
2-4X increase in SOD. Increased ozone tolerance	Alfalfa chloroplast	Mitochondrial Mn-SOD Tobacco
8X increase in SOD. No effect on ozone tolerance	Tobacco mitochondria	Mitochondrial Mn-SOD Tobacco
Increased aluminium tolerance	Canola	Mn SOD
3-15X increase in SOD. Increased tolerance to high light and chilling	Tobacco chloroplast	Chloroplast Cu/Zn-SOD Pea
1.5-6X increase in SOD. Reduced damage from acute ozone exposure	Tobacco cytosol	Cytosolic Cu/Zn-SOD
Protected plants from ozone damage	Tobacco	Fe-SOD *Arabidopsis*
Increased protection against oxidative stress	Tobacco	*Apx3* (ascorbate peroxidase)
Heat tolerance	*Arabidopsis*	*Apx1* (ascorbate peroxidase)
Increased stress tolerance	Tobacco	GST/GPX (glutathione S-transferase with glutathione peroxidase)
Sustained growth under cold and salinity stress	Tobacco	*Nt107* (glutathione S-transferase)
Protects against aluminium toxicity and oxidative stress	*Arabidopsis*	*ParB* (glutathione S-transferase)
Protects against aluminium toxicity and oxidative stress	*Arabidopsis*	*NtPox* (glutathione peroxidase)
3-6X increase in foliar GR. Increased tolerance to SO_2 and paraquat	Tobacco chloroplast	Glutathione reductase *E. coli*
1-35X increase in GR. Increased tolerance to paraquat	Tobacco cytosol	Glutathione reductase *E. coli*
100X increase in GS. GSH not increased. No effect on paraquat tolerance	Poplar cytosol	Glutathione synthetase *E. coli*
Increased tolerance to oxidative damage caused by excess iron	Tobacco	*MsFer* Alfalfa ferritin

SOD, superoxide dismutase; GST, glutathione S-transferase; GPX, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GS, glutathione synthetase; GSH, glutathione.

جدول (١٧-٤): حالات متنوعة من التحول الوراثى لأجل زيادة التحمل لمختلف عوامل الشدّ البيئى.

النبات المحول وراثيًّا	الجين المستعمل	المركب المعبر عنه	حالة التحمل
التبغ	Mannitol 1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) from *E. coli*	Mannitol	الملوحة
Arabidopsis	*MtlD* from *E. coli*	Mannitol	الملوحة
التبغ	*SacB* from *Bacillus subtilis*	Fructan	الجفاف
التبغ	TPS1 subunit encoding trehalose synthase from *E. coli*	Trehalose	الجفاف
التبغ	γ-Pyrroline-5-carboxylate synthetase	Proline	الشدّ الأسموزى
الأرز	Barley *lea* gene (*HVA1*)	LEA	الجفاف والملوحة
التبغ	*BetA* from *E. coli* encoding choline dehydrogenase	Glycine betaine	الملوحة
الأرز	*CodA* from *Arthrobacter globiformis* endcoding choline oxidase	Glycine betaine	الملوحة
Arabidopsis thaliana	*CodA* from *Arthrobacter globiformis endcoding choline oxidase*	Glycine betaine	الملوحة والبرودة

• تتراكم فى النباتات - عادة - بروتينات خاصة خلال المراحل المتأخرة لتكوين الأجنة أثناء فترات التعرض للجفاف، يعتقد بأنها توفر للخلايا حماية من الشدّ بالمرتبط بالفقد الرطوبى. يُعبر عن أحد هذه الجينات - وهو le25 - فى أوراق الطماطم وجذورها استجابة للنقص الرطوبى وتراكم حامض الأبسيسك. ولقد درست وظيفة هذا الجين وتأثير التعبير عنه فى الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* بعد تحويلها وراثيًّا، حيث أظهرت الخميرة عدة استجابات لنوعيات مختلفة من الشدّ البيئى، منها: تحسن النمو فى بيئة تحتوى على ١,٢ مولار كلوريد صوديوم، مقارنة بمدى نمو نظيراتها غير المحولة وراثيًّا فى الظروف ذاتها. هذا .. إلاّ إنه لم يحدث لها تحسن فى النمو فى بيئة تحتوى على ٢ مولار سوربيتول sorbitol. كذلك أظهرت الخميرة المحولة وراثيًّا قدرة أكبر على البقاء بعد التعرض للتجمد، ولكن ليس بعد التعرض لظروف الحرارة العالية (Imai وآخرون ١٩٩٦).

ﻫ أمكن تحويل الطماطم وراثيًّا بجين الـ oxalate oxidase، بهدف جعلها أكثر تحملاً للملوحة العالية. وأوضحت الدراسات تواجد نشاط إنزيم الـ oxalate oxidase فى جميع النباتات التى حولت وراثيًا، وأن هذه النباتات أعطت محصولاً أعلى جوهريًّا تحت ظروف الشد الملحى – وكذلك تحت الظروف العادية – عما أعطته نباتات الكنترول ولقد أثَّر الشد الملحى – كذلك – على مستوى نشاط الإنزيم فى كل من الثمار والجذور (Dessalegne وآخرون ١٩٩٧).

ﻫ من المعروف أن زيادة التعبير عن الجين HAL1 فى الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* يجعلها أكثر تحملاً للملوحة، وذلك بجعلها تحتفظ بتركيزات عالية من البوتاسيوم مع تركيزات منخفضة من الصوديوم أثناء حالات الشدِّ الملحى وبتحويل الطماطم وراثيًا بهذا الجين أصبحت أكثر تحملا للملوحة، كما كانت النباتات المحولة وراثيًّا أكثر قدرة على الاحتفاظ بالبوتاسيوم داخل الخلايا، حيث ظهر فيها ارتفاع واضح فى نسبة أيون البوتاسيوم إلى أيون الصوديوم عما فى النباتات غير المحولة وراثيًّا (Gisbert وآخرون ٢٠٠٠).

ﻫ كذلك أمكن تحويل القاوون وراثيًّا بهذا الجين. HAL1، وفى بيئات صناعية تحتوى على ١٠ جم كلوريد صوديوم/لتر أظهرت النباتات المحولة وراثيًّا قدرًا أعلى من التحمل للملح عن نباتات الكنترول، على الرغم من انخفاض نموها الجذرى والخضرى مقارنة بنمو النباتات المحولة وراثيًّا التى نُميت فى بيئة غير ملحية (Bordas وآخرون ١٩٩٧).

تحمل ظروف الجفاف

من المعروف أن عديدًا من النباتات تستجيب لظروف الجفاف بتمثيل مجموعة من مشتقات السكر يطلق عليها اسم بوليولات polyols (مثل المانيتول mannitol، والسوربيتول .. إلخ)؛ ولذا .. يعتقد بأن النباتات ذات المحتوى العالى من البوليولات قد تكون أكثر تحملاً لظروف الشدِّ البيئى. وباستعمال جين بكتيرى يشفر لإنزيم قادر على تمثيل المانيتول أمكن هندسة نباتات وراثيًّا يتراكم فيها المانيتول إلى مستويات عالية

نسبيًا (حوالى ٣٠–٤٠ جم من المانيتول لكل كيلوجرام من النبات). وقد أظهرت تلك النباتات قدرة أكبر على تحمل ظروف الجفاف عن نظيراتها التى لم تحول وراثيًا (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

تحمل الحرارة العالية

تستخدم فى عمليات التحول الوراثى الجينات التى تتحكم فى إنتاج بروتينات خاصة فى النباتات لدى تعرضها للصدمات الحرارية، وهى التى تعرف باسم heat-shock proteins، وتعرف منها أنواعًا كثيرة. ويبين جدول (١٧–٥) عددًا من تلك الجينات، والبروتينات التى تتحكم فى إنتاجها، والنباتات التى حولت وراثيًا بها.

جدول (١٧–٥): جينات التحول الوراثى لأجل تحمل الحرارة العالية (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الجين	البروتين الذى يتحكم الجين فى إنتاجه	النبات المحول وراثيًا
AtHSF1	Heat-shock transcription factor HSF1::GUS fusion	*Arabidopsis*
Hsp101	HSP100 class heat-shock protein	*Arabidopsis*
Hsp70	HSP70 class heat-shock protein	*Arabidopsis*
Hsp17.7	SmHSP small heat-shock protein family	الجزر
Tl.HS1	Class I smHSP	التبغ

تحمل الحرارة المنخفضة والتجمد

تعد القدرة على تحمل الحرارة المنخفضة أو التجمد صفة معقدة تتأثر بعديد من الجينات التى تؤثر – بالتالى – فى عديد من المسارات الأيضية. وعلى سبيل المثال .. فإن التغيرات فى التعبير الجينى أثناء عملية التأقلم على الحرارة المنخفضة تتضمن عدم تشبع الأغشية الخلوية، وتراكمات فى كل من السكر، والبروتين، والأحماض النووية، والمركبات التى تزيد من الضغط الإسموزى، والهرمونات ... إلخ. ومن المعتقد أن تلك التغيرات تنظم توقيت ومعدل حدوث حالة الأقلمة ومستوى الأقلمة التى تصل إليها

النباتات، ومدة اكتساب النباتات لها خلال فصل الشتاء، ومعدل فقدها لها عند ارتفاع درجة الحرارة في الربيع ولهذه الأسباب فإن دراسات التحول الوراثي لأجل زيادة القدرة على تحمل البرودة أو التجمد لم تأت بنتائج فعالة كثيرًا

تحمل الحرارة المنخفضة

تبين لدى مقارنة الأحماض الدهنية في الأغشية الخلوية للنباتات الحساسة للبرودة بتلك التي تكون في النباتات المتحملة لها، وفي النباتات التي أقلمت على البرودة مقابل تلك التي لم تؤقلم تبين وجود وفرة أكبر من الأحماض الدهنية التي تحتوى إما على رابطتين غير مشبعتين (حامض اللينوليك linoleic acid)، وإما على ثلاث روابط غير مشبعة (حامض اللينولينك linolenic acid) بكل حامض دهني من الدهون الفوسفورية التي توجد في الأغشية الخلوية بالنباتات الأكثر تحملا للبرودة عن الأقل تحملاً، وبالنباتات الأكثر تأقلما على البرودة عن غير المؤقلمة، هذا مع العلم بأن الأحماض الدهنية غير المشبعة تجعل الأغشية الخلوية أكثر سيولة في الحرارة المنخفضة، مما يمنع صلابتها عند انخفاض الحرارة إلى أقل من ١٠ْم

ومن المعلوم أن معظم الـ cyanobacteria وعديد من النباتات تحتوى على مستويات عالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة في أغشيتها الخلوية، ولقد وجد أن الجينات الخاصة بعدم تشبع الأحماض الدهنية fatty acid desaturases (مثل الجينات desA، و desB، و desC في السيانوبكتيريا *Synechocystus* sp) هي المسئولة عن تحملها للحرارة المنخفضة

وقد أمكن تحديد وعزل ونقل الجين الذى يشفر لتكوين الإنزيم glycerol-3-phosphate acyltransferase الذى يختص بإضافة ولحام الأحماض الدهنية غير المشبعة إلى العمود الفقرى الجليسرولى glycerol backbone للدهون الفوسفورية، وبذا أمكن هندسة نباتات وراثيًا (نباتات التبغ) كانت أكثر تحملاً للحرارة المنخفضة (عن Murata وآخرين ١٩٩٦، و Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

تحمل التجمد

من بين دراسات التحول الوراثى التى أجريت بهدف زيادة القدرة على تحمل التجمد، ما يلى:

● أوضحت دراسات Culter وآخرون (١٩٨٩) أن البروتين المضاد للتجمد المتحصل عليه من نوع السمك القطبى *Pseudopleuronectes americanus* لدية القدرة على للعمل كمضاد لبدء تكوين نويات البللورات الثلجية anti-nucleator فى الأنسجة النباتية. وأدى تعريض المزارع المعلقة لـ *Bromus intermis* للبروتين المضاد للتجمد إلى خفض كميات الماء القابل للتجمد فى أى درجة حرارة. كما أوضحت الدراسة أن هذا البروتين يمكن أن يعمل كواقٍ من أضرار التجمد العميق (أى إنه يعمل كـ cryoprotectant)، وأنه قلل من معدل تكوين البللورات الثلجية.

● أدى تحويل نباتات التبغ وراثيًّا لتعبر عن البروتين: AFP type II، و AFP type III اللذان يتحكم فيهما جينين حُصل عليهما من نوع السمك القطبى *Pseudopleuronectes americanus* (الذى أسلفنا الإشارة إليه والذى يعرف فى الإنجليزية باسم flounder) .. أدى ذلك إلى جعلها تتحمل حرارة وصلت إلى -٣,٥ إلى -٥,٤م، وهى تقل بمقدار ١-١,٥م - فقط - عن تلك التى تحملتها نباتات الكنترول (عن Gusta وآخرين ١٩٩٦).

● أنتج Hightower وآخرون (١٩٩١) نباتات تبغ وطماطم محولة وراثيًّا بالجين afa3 المضاد للتجمد والمجهز صناعيًّا على أساس جين الـ antifreeze الخاص بالسمك القطبى *P. americanus*، إلاّ أنه لم يكن مؤثرًا فى منع التجمد.

○ تمكن الباحثون من تخليق جين يشفر لتكوين بروتين مضاد للتجمد مماثل للبروتين الذى ينتجه سمك الـ winter flounder، وأمكن التعبير عن هذا الجين فى الخميرة وعدد من النباتات. ويمكن لهذه النباتات المعدلة وراثيًّا تحمل التجمد والتفكك بصورة أفضل دون أن تفقد خصائصها المتعلقة بالمذاق والقوام. وفى البطاطس ظهر ارتباط بين مستوى التعبير عن الجين المنقول ودرجة تحملها للتجمد. كذلك يمكن إضافة هذا

البروتين إلى ألايس كريم لمنع تكوين القوام الجيبى للبلورات الثلجية (Wallis وآخرون ١٩٩٧، و عن Malik وآخرين ١٩٩٩).

● أدى تعديل نباتات الـ *Arabidopsis* غير المتحملة للبرودة – وراثيًّا – بجين الـ cor15a *Arabidopsis*، (المتحصل عليه من سلالة متحملة للبرودة) إلى حمايتها من حرارة وصلت إلى -٤ وحتى -٥°م، مما يدل على أن هذا الجين (الذى يوفر حماية للإنزيم الحساس للبرودة lactate dehydrogenase من الدنترة ووقف النشاط، والذى يتواجد البروتين الذى يتحكم الجين فى إنتاجه فى الكلوروبلاستيدات) ربما يلعب دورا فى حماية الكلوروبلاستيدات أثناء التجمد.

● يلزم الإنزيم سوبر أوكسيديز ديسميوتيز superoxidase dismutase (اختصارًا SOM) لأجل التخلص من الـ superoxide free radicals السامة التى تنتج فى ظروف الشدّ البيئى وقد اقتُرح أن التعبير الزائد للبروتين الـ SOD يمكن أن يُحسِّن من القدرة على تحمل التجمد فى النباتات. وبالفعل .. تم تحويل البرسيم الحجازى وراثيًّا بجين الـ Mn-SOD الميتوكوندرى والبلاستيدى (mitochondrial and chloroplast Mn-SOD) من النوع *Nicotiana plumbaginifolia*، وأظهرت النباتات المحولة وراثيًّا قدرًا أكبر من النشاط الكلى للـ SOD بالأوراق، واستعادة أكبر للنمو – على أساس إنتاج المادة الجافة بالنموات الخضرية – بعد تعرضها لحرارة التجمد. كذلك أدت زيادة التعبير الخاص بالجين Cu/Zn-SOD – من البسلة – فى التبغ والبيتونيا إلى إحداث خفض كبير فى الأضرار التى تحدث لعملية البناء الضوئى خلال ظروف التعرض للحرارة المنخفضة والإضاءة العالية، كما حفزت استعادة البناء الضوئى لمعدله الطبيعى بعد دورة من التجمد والتفكك (عن Gusta وآخرين ١٩٩٦).

الفصل الثامن عشر

الهندسة الوراثية لتحسين صفات الجودة

تتنوع كثيرًا صفات الجودة المرغوب فيها بتنوع المحاصيل والأنواع النباتية، ولذا .. فإننا نتناول هذا الموضوع بنظرة عامة، ولا نتطرق إلى التفاصيل الدقيقة لصفات الجودة فى كل محصول على حدة إلاّ بالقدر الذى يتناسب مع مقدار الجهد الذى بذل لأجل تحسين صفات الجودة المعنية فى تلك المحاصيل. وسوف نولى فى هذا الفصل اهتمامًا خاصًا لموضوع تحسين القيمة الغذائية كأحد أهم عناصر صفات الجودة ذات الطبيعة العامة، بالإضافة إلى التركيز على بعض صفات الجودة الخاصة فى كل من الخضر الثمرية ونباتات الزهور.

التحول الوراثى لتحسين القيمة الغذائية

التحسين الكمى والنوعى للمحتوى البروتينى

أمكن عن طريق الهندسة الوراثية إحداث تغييرات هامة فى مخزون البذور من البروتين كمًا ونوعًا، وذلك بهدف تحقيق الأغراض التالية:

١ – زيادة المحتوى البروتينى للبذور.

٢ – زيادة محتوى البذور من الأحماض الأمينية الضرورية، مثل الليسين، والمثيونين.

٣ – جعل البذور تقوم بتخزين أنواع جديدة من البروتينات أفضل فى قيمتها الغذائية.

٤ – زيادة محتوى حبوب القمح من البروتين ذات الوزن الجزيئى المرتفع: جلوتينين glutenin؛ الذى يؤدى إلى زيادة لدانة الطحين.

أهمية تحسين المحتوى البروتيني

لا يمكن لجسم الإنسان أن يقوم بتمثيل سوى عشرة أحماض أمينية فقط من بين العشرين حمضا أمينيًا التى تتكون منها مختلف البروتينات، أما العشرة أحماض الأخرى، فإن تواجدها فى غذائه يعد ضروريًا لأنه لا يستطيع تمثيلها مما يتوفر بالغذاء من مصادر كربونية ونيتروجينية ولذا يتعين تواجد توازن بين الأحماض الأمينية التى يتناولها الإنسان فى غذائه، الأمر الذى قد يشكل مشكلة أحيانًا كما هو الحال عند الاعتماد الكبير على الحبوب – التى تعد مصدرا هامًا للطاقة – وبذور البقول – التى تعد مصدرا رئيسيًا للبروتينات، ذلك لأن الحبوب الصغيرة غالبًا ما تكون فقيرة فى الحامض الأمينى الضرورى ليسين lysine، بينما تكون بذور البقوليات – غالبا - فقيرة فى الحمضين الأمينيين الكبريتيين مثيونين methionine، وسيستين cysteine

وتجدر الإشارة إلى أن الحيوانات الزراعية يمكنها تحويل المثيونين إلى سيستين، ولكنها لا تستطيع إجراء التحويل العكسى، ولذا يسعى مربو النبات – من خلال تقنيات الهندسة الوراثية – إلى إنتاج محاصيل تصلح لغذاء الحيوانات الزراعية تكون أكثر غنى فى محتواها من البروتين بصورة عامة، ومن البروتينات الغنية فى الأحماض الأمينية الكبريتية والحامض الأمينى مثيونين methionine بصورة خاصة

استراتيجيات تحسين المحتوى البروتيني

تنوعت الاستراتيجيات التى اتبعت لأجل تحسين المحتوى البروتينى للنباتات التى تستعمل كغذاء للإنسان والحيوانات الزراعية، كما يلى

١ – الاعتماد على جينات نباتية محورة:

جرت محاولة لعزل جين مسئول عن إنتاج بروتين فقير فى الأحماض الأمينية الكبريتية، تم تحوير تتابعاته من القواعد الآزوتية بما يسمح بتشفيره لمزيد من الأحماض الكبريتية، ولقد حدث ذلك بالنسبة لبروتينات، مثل الفاصولين phaseolin من الفاصوليا، والفيسلين vicilin من الفول، إلاّ أن البروتينات الناتجة المحورة كانت إما غير ثابتة، وإما كانت فقيرة جدًا فى المثيونين، مما جعلها بغير ذى فائدة

٢ - الاعتماد على جينات مخلقة معمليًا:

جرت محاولات أخرى لتشكيل جينات كاملة فى المعمل تشفر لتكوين بروتينات غنية فى الأحماض الأمينية الكبريتية، ونجح بالفعل إنتاج بروتين جديد يحتوى على ١٣٪ مثيونين، وأمكن التعبير عن الجين الصناعى - الذى يشفر لتكوينه - فى البطاطا.

٣ - الاعتماد على جينات ذات أصول نباتية:

أمكن التعرف على عديد من البروتينات الغنية فى المثيونين فى كل من: الذرة (البروتين 21-kDa zein الذى يحتوى على ٢٨٪ مثيونين، والبروتين 10-kDa zein الذى يحتوى على ٢٣٪ مثيونين)، والأرز (البروتين 10-kD prolamin الذى يحتوى على ٢٠٪ مثيونين)، ودوار الشمس (البروتين 2S sunflower seed albumin الذى يحتوى على ١٦٪ مثيونين، و ٨٪ سيتوسين)، والكاجو (جوز البرازيل) Brazil nut (ألبيومين الكاجو الذى يحتوى على ١٨٪ مثيونين، و ٨٪ سيتوسين). ولقد أمكن نقل الجينات المسئولة عن تمثيل تلك المركبات إلى عدد من المحاصيل الزراعية، منها الذرة، وفول الصويا، والترمس، ولفت الزيت (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

ومن أبرز الأمثلة على عمليات التحول الوراثى لتحسين المحتوى البروتينى بالاعتماد على الجينات ذات الأصل النباتى، ما يلى:

○ جرت محاولات عديدة لزيادة محتوى بعض المحاصيل الزراعية الهامة من الحامض الأمينى الضرورى ليسين lysine، ومن أبرز حالات النجاح فى هذا المجال، ما يلى

المحصول (البذور)	الجين المنقول ومصدره	عدد أضعاف الزيادة فى الليسين: الحر	عدد أضعاف الزيادة فى الليسين: الكلى
لفت الزيت	dhdps من البكتيريا *Corynebacterium*	٣,١-١٤٠	١-١,٧٥
لفت الزيت	Dhdps من البكتيريا *Corynebacterium*، و ak من البكتيريا *E. coli*	٤,٧-٣٨	١-٢,٠
فول الصويا	Dhdps من البكتيريا *Corynebacterium*	١٢-٢٥	١,٢٥

المحصول (البذور)	الجين المنقول ومصدره	عدد أضعاف الزيادة في الليسين	
		الحر	الكلى
فول الصويا	Dhdps من البكتيريا *Corynebacterium*		
	، و ak من *E. coli*	٣٣٥	٠,٩–٤,٧
الشعير	Dhdps من *E. coli*	٢	١,٠٥

• جرت محاولات مماثلة لتحسين مستوى الليسين بطرق الهندسة الوراثية في كل من البطاطس (التي تحسن فيها محتوى الليسين الحر في الدرنات بمقدار خمسة أضعاف دون حدوث أي تغير في محصول الدرنات أو مواصفاتها الأخرى)، والذرة الرفيعة (التي لم يتحقق فيها نجاح مماثل). وقد أجرى التحول الوراثي في كلا المحصولين باستعمال الطفرة dhdps-r1 (عن Jacobs وآخرين ٢٠٠٢).

• أمكن عزل الجين المسئول عن تكوين بروتين جوز البرازيل (الكاجو) Brazil nut (أو *Bertholletia excelsa*) – المعروف باسم BN2S protein – والذي يحتوي على مثيونين methionine بنسبة ١٩٪، وسيستين cysteine بنسبة ٨٪ – أمكن عزل هذا الجين ونقله بطرق الهندسة الوراثية إلى البطاطس، حيث عبر عن ذاته في كل من أنصال الأوراق، وأعناق الأوراق والدرنات، مع تركيز للبروتين في الدرنات يزيد بمقدار ٨ أمثال عن التركيز في الأوراق وأعناق الأوراق. وبينما لم يكن للتعبير عن هذا الجين أي تأثيرات ضارة على نباتات البطاطس، فإن تركيز البروتين لم يرتفع إلى درجة يمكن أن تؤثر في مستوى المثيونين بالدرنات (Tu وآخرون ١٩٩٤) ومن مساوئ الاعتماد على هذا البروتين أنه يسبب الحساسية لدى الأفراد ذوي الحساسية للكاجو؛ بما يعني حتمية إجراء اختبارات دقيقة وموسعة قبل الاعتماد على مثل هذه البروتينات المسببة للحساسية في عمليات التحول الوراثي (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

• على الرغم من أن الفاصوليا من المحاصيل البقولية الهامة، فإنها تعد فقيرة في الحامض الأميني الضروري مثيونين methionine، ولقد أمكن تحويلها وراثيًا بجين مسئول عن تكوين بروتين الكاجو الذي أسلفنا الإشارة إليه، وبلغ مستوى حامض المثيونين في النباتات المحولة وراثيًا قيمًا تزيد بمقدار ١٤–٢٣٪ عن نظيراتها في النباتات غير المحولة وراثيًا (Aragao وآخرين ١٩٩٩)

• أمكن التعبير عن بروتين غنى فى الليسين فى إندوسبرم الأرز. ولأجل تحقيق أفضل تعبير عن البروتين ومكان التعبير عنه فى الأرز وقع الاختيار على بروتين فول الصويا: الجليسينين glycinin، وهو أحد أفراد عائلة الجلوبيولين 11S globulin. ومن أهم خصائص الجليسينين أنه يُمثَّل ويخزن فى فول الصويا بطريقة تتشابه كثيرًا مع حالة جلوتيلينات glutelins الأرز. وقد تبين عند دراسة نباتات الأرز المحولة وراثيًّا أن كِلا الجلوبيولينين (الجلوتيلين والجليسينين) عُبِّر عنهما وكونا معقدات بأحجام مميزة كان من السهل التعرف عليها، وبغير حدوث ذلك لم يكن من الممكن الحصول على مستويات مثلى من البروتينات. ومن الأمور الأخرى الهامة لبروتينات الجليسينين فى فول الصويا أنها تكون مصاحبةً بتأثير hypocholesterolaemic (خافض للكوليسترول) إذا زاد ما يتناوله الإنسان منها فى طعامه عن ٦ جم يوميًّا. وبذا .. فإن التعبير عن جين فول الصويا فى الأرز له ميزتان: زيادة محتوى إندوسبرم الأرز من الليسين، والإسهام فى زيادة ما يحصل عليه الإنسان من جلوبيولينات فول الصويا ذات التأثير المخفض للكوليسترول (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

• أمكن عزل الجين AmA1 من النبات *Amaranthus hypochondriacus*، وهو جين مسئول عن تكوين بروتين الألبيومين البذرى، الذى يتميز بكونه لا يسبب الحساسية، وبغناه فى الأحماض الأمينية الضرورية. وتبعًا لمعايير منظمة الصحة العالمية للتغذية المثالية للإنسان فإن هذا البروتين تنطبق عليه الشروط المثالثة. أمكن نقل هذا الجين إلى البطاطس بطرق الهندسة الوراثية، وبالدراسة .. وجد أن النباتات المحولة وراثيًّا كانت أقوى نموًّا، وأكثر إنتاجًا للدرنات، وكانت درناتها أعلى فى محتواها البروتينى، مع زيادة فى معظم الأحماض الأمينية الضرورية – وبصورة واضحة – عما كان عليه الحال فى النباتات غير المحولة وراثيًّا. وقد عبرت البطاطس عن البروتين الجديد المنقول إليها فى كل من السيتوبلازم والفجوات العصارية (Chakraborty وآخرون ٢٠٠٠).

• كذلك طورت فى الهند أصنافًا من البطاطا محولة وراثيًّا غنية فى قيمتها الغذائية بنقل هذا الجين (AmA1) إليها من *A. hypochondriacus*. يتحكم هذا الجين فى إنتاج

بروتينًا خاصًا فى السيتوبلازم والفجوات العصارية للبطاطا. وكما أسلفنا .. فإن هذا البروتين لا يسبب الحساسية، ويتميز بارتفاع محتواه من جميع الأحماض الأمينية الضرورية ويعد – تبعًا لمنظمة الصحة العالمية – مثاليًا لتغذية الإنسان (عن Ahloowalia & Khush ٢٠٠١)

o جرت – كذلك – محاولات لزيادة محتوى البرسيم الحجازى – الذى تتغذى عليه الأغنام – فى محتواها من الأحماض الأمينية المحتوية على الكبريت، بهدف زيادة إنتاجها من الصوف، علمًا بأن الصوف ذاته عبارة عن بروتين غنى جدًا بالكبريت، وأن نموه يتحدد بمدى توفر الكبريت فى العليقة المستخدمة (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

٤ – الاعتماد على جينات ذات أصول حيوانية:

تمكن العلماء من نقل جين الدواجن ovalbumin إلى البرسيم الحجازى (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

التحسين الكمى والنوعى للمحتوى الكربوهيدراتى

لم يقتصر الاهتمام بعمليات التحول الوراثى لأجل التحسين الكمى والنوعى للمستوى الكربوهيدراتى على الجانب الغذائى فقط، بل شمل كذلك الجوانب الصيدلانية والصناعية، كما يلى:

أولاً: الجوانب الغذائية والصناعات الغذائية

من بين الأمثلة على عمليات التحول الوراثى لأجل التأثير فى المحتوى الكربوهيدراتى للمحاصيل الزراعية بما يجعلها أكثر صلاحية كغذاء، أو أكثر صلاحية لعمليات التصنيع الغذائى، ما يلى:

١ – التأثير فى المحتوى النشوى لدرنات البطاطس:

من بين الدراسات فى هذا المجال، ما يلى:

أ – زيادة المحتوى النشوى للدرنات.

لا تزيد نسبة النشا فى أصناف البطاطس التجارية المتداولة عن ٢٢٪، وبينما تكون

الأصناف التى تحتوى على تلك النسبة المرتفعة أو القريبة منها هى الأصلح لصناعة الشبس، فإن النسبة المثلى للنشا فى الدرنات لأجل صناعة الشبس هى ٢٥٪، وهى نسبة لا تتوفر فى أى من أصناف البطاطس التجارية أو سلالاتها وأنواعها البرية. وقد أمكن بالفعل تحقيق هذا الهدف باستعمال تقنيات الهندسة الوراثية بالاعتماد على جين حُصِلَ عليه من أحد الأنواع البكتيرية.

يؤثر هذا الجين فى عملية تمثيل النشا ذاتها. فجزئ النشا فالنشا – وهو الذى يتركب من جزيئات جلوكوز كثيرة متراصة – ينمو بنقل جزيئات الجلوكوز واحدة تلو الأخرى من مصدر مانح للجلوكوز يسمى ADP-glucose إلى مستقبل له. ويبدو أن الإنزيم المسئول عن هذا النقل يوجد بوفرة فى البطاطس، إلاّ أن الإنزيم المسئول عن تكوين الـ ADP-glucose لا يوجد بوفرة. وقد أمكن عزل هذا الجين (adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase) من أحد الأنواع البكتيرية ونقله إلى البطاطس، حيث أظهرت النباتات المحولة وراثيًا تمثيلاً سريعًا للـ ADP-glucose عن النباتات العادية، ومن ثم كانت أقدر على إنتاج النشا (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

ب – منع التحول الإنزيمى لنشا البطاطس إلى سكر

من الممكن تخزين البطاطس لفترات طويلة فى الحرارة المنخفضة، إلاّ أن النشا يتحول – فى تلك الظروف – إلى سكر، الأمر الذى يجعلها غير صالحة للقلى أو لصناعة الشبس. ولقد أمكن منع هذا التحول الإنزيمى للنشا بتحويل البطاطس وراثيًا بـ "tobacco invertase-inhibitor-like protein" (عن Kempken ٢٠٠١).

ثانيًا: الجوانب الصناعية

تلعب المركبات الكربوهيدراتية دورًا كبيرًا فى الصناعة، ونتناول هذا الأمر بالشرح من الجوانب التى لاقت اهتمام العاملين فى مجال الهندسة الوراثية.

المحتوى النشوى:

لا ينظر إلى النشا فى الصناعة كمصدر للسعرات الحرارية، ولكن كمادة خام يكمن أن

تصنع منها مواد أخرى تدخل فى صناعة الأغذية أو الصناعات الأخرى ويمكن لعمليات التخمر تحويل النشا إلى عديد من المركبات المفيدة الأخرى، علمًا بأن نحو ١٠٪ من الإنتاج الكلى للنشا يستعمل بهذه الطريقة.

يتكون النشا من مخلوط من نوعين من المركبات الكربوهيدراتية الكبيرة المعقدة، هما: الأميلوز amylose، والأميلوبكتين amylopectin. يتكون الأميلوز من سلسلة طولية من جزيئات الجلوكوز يتراوح طولها بين ١٠٠٠ إلى ٢٠٠٠٠ جزئ، ويتباين هذا الطول باختلاف النوع النباتي. أما الأميلوبكتين فهو يتكون من نحو ٣٠٠٠٠٠ إلى ثلاثة ملايين من جزيئات الجلوكوز المتفرعة. ويحدد المحتوى النسبى للأميلوز والأميلوبكتين فى النشا خصائصه الكيميائية والفيزيائية، وبالتالى مدى صلاحيته لإنتاج بعض المنتجات الصناعية، وللاستعمال فى مختلف الصناعات الغذائية.

يعتمد تمثيل النشا على ثلاثة إنزيمات، وهى التى يحدد مستواها النسبى الكميات النسبية لكل من الأميلوز والأميلوبكتين (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

وقد أمكن الحصول على نباتات بطاطس ذات مستوى منخفض من الأميلوز بالدرنات من خلال تثبيط التعبير عن الجين المسئول عن التشفير لتكوين الإنزيم granule-bound starch synthase (اختصارًا GBSS) باستعمال الشفرة العكسية (antisense RNA-mediated inhibition). هذا علمًا بأن GBSS هو أحد الإنزيمات الرئيسية التى تلزم لتمثيل النشا، وهو المسئول عن تكوين الأميلوز. وقد أدت عملية التحول الوراثى تلك إلى منع تكوين الإنزيم GBSS، ومن ثم منع تكوين الأميلوز كلية، دون أن يكون لذلك أدنى تأثير على محصول الدرنات المحولة وراثيًا، أو محتواها من النشا والسكر، أو صفات الجودة الخاصة بها (Kuipers وآخرون ١٩٩٤).

كذلك أمكن تحويل البطاطس وراثيًا بالشفرة العكسية للجين المسئول عن تكوين الإنزيم ADP-glucose pyrophosphorylase – بهدف تثبيط تكوين النشا – وهو ما أنقص – بشدة محتوى الدرنات من المادة الجافة، مع حدوث انخفاض شديد مماثل فى محتواها من النشا، ومع تراكم فى محتواها من السكريات الذائبة. وقد حولت تلك

النباتات – التى يثبط فيها تمثيل النشا – حولت وراثيًا بالجين المسئول عن تمثيل الإنزيم levan sucrase من البكتيريا *Erwinia amylovora*. أدى هذا التعديل الوراثى الأخير إلى تراكم الفروكتان fructan بالدرنات بنسبة بلغت ٢١٪ من وزنها الجاف، وكان هذا الفروكتان مماثلاً تمامًا للـ levan المعزول من *E. amylovora* (Rober وآخرون ١٩٩٦).

المحتوى من المركبات الكربوهيدراتية الأخرى:

من بين حالات التحول الوراثى التى استهدفت التأثير فى إنتاج مختلف المواد الكربوهيدراتية الأخرى فى النباتات للأغراض الصناعية، ما يلى:

١ – تحويل التبغ والبطاطس والذرة وراثيًا بالجين fructosyl transferase من البكتيريا *Bacillus subtilis* لجعلها تخزن الفروكتان fructan، علمًا بأنها لا تخزن هذا المركب الكربوهيدراتى بصورة طبيعية.

٢ – تحويل التبغ وراثيًا بالجين mannitol-1-phosphate dehydrogenase (ورمزه mtlD) من البكتيريا *E. coli*؛ لأجل تمثيل كمية أكبر من المانيتول mannitol، علمًا بأن النباتات المحولة وراثيًا كانت أكثر تحملاً للتركيزات العالية من الأملاح.

٣ – تحويل التبغ وراثيًا بالجين myo-inositol o-methyl transferase من *Mesembryanthemum crystallimum* (نبات الثلج ice plant)، لأجل إنتاج الـ cyclic sugar alcohol من الـ myo-inositol.

٤ – تمثيل كميات صغيرة من التريهالوز trehalose من نباتات التبغ المحولة وراثيًا، علمًا بأن المركب يضاف إلى الأغذية المصنعة والمجففة لإكسابها طعمًا أفضل (عن Chawla ٢٠٠٠).

٥ – تحويل بنجر السكر وراثيًا بجين من الخرشوف لأجل إنتاج الفروكتانات.

٦ – كذلك تحويل التبغ وراثيًا بجين من *E. coli* لأجل إنتاج الفروكتانات أيضًا (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

ثالثا. الجوانب الصيدلانية

أمكن تحويل البطاطس وراثيًا بجين بكتيرى (حُصِل عليه من البكتيريا *Klebsiella preumoniae*) يشفر لإنتاج إنزيم يتخصص فى تمثيل جزيئات نشا صغيرة حلقية يحتوى كل منها على ٧-٨ جزيئات جلوكوز. تعرف هذه الجزيئات باسم سيكلودكسترينات cyclodextrins، ويمكنها تكوين معقدات مع جزيئات أخرى صغيرة بداخلها، وبهذه الطريقة تكتسب تلك الجزيئات خصائص جديدة، مثل زيادة الثبات والقدرة على الذوبان. ولهذه السيكلودكسترينات استعمالات صيدلانية، وتستخدم فى التخلص من المركبات غير المرغوب فيها (مثل الكافيين) من الأغذية. ونظرًا لأن إنتاج تلك السيكلودكسترينات صناعيًا يعد أمرًا مكلفًا، فإن الحصول عليها من درنات البطاطس المحولة وراثيًا مباشرة يعد أمرًا واعدًا (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

أمكن - كذلك - تحويل البطاطس وراثيًا بالجينين المسئولين عن تمثل الإنزيمين sucrose sucrose 1-fructosyltransferase، و fructan-fructan 1-fructosyltransferase والمتحصل عليهما من الخرشوف، والمسئولين عن تمثيل جزيئات الإنيولين inulin بكل أطوال السلاسل التى تتكون بصورة طبيعية، والتى تكونت فى درنات البطاطس التى حولت وراثيًا بنسبة ٥٪ من الوزن الجاف، وكان ذلك مصاحبا بنقص فى محتوى تلك الدرنات من النشا، مما يدل على أن تمثيل الإنيولين لم يؤد إلى زيادة القدرة التخزينية للمواد الكربوهيدراتية فى الدرنات (Hellwege وآخرون ٢٠٠٠)

التحسين النوعى لمحتوى الدهون

تتحدد نوعية الزيوت والدهون بكل من محتواها من الأحماض الدهنية، وطول السلسلة، ودرجة عدم التشبع، والمجموعات الكيميائية المرتبطة بها ... إلخ.

وتتكون جميع الزيوت الصالحة لغذاء الإنسان (ومعظم الزيوت غير صالحة) من أحماض دهنية تتشابه فى احتوائها على ١٨ ذرة كربون مع رابطة واحدة غير مشبعة بها، أو رابطتين أو ثلاث. وباستثناء زيت الزيتون وزيت الكانولا (لفت الزيت) اللذان يتميزان بانخفاض محتواهما من الأحماض الدهنية المشبعة، ودهن الكاكاو الذى يتميز

بخصائص فيزيائية تجعله أكثر صلاحية لمنتجات التجميل والحلويات فإن باقى الزيوت تتماثل معًا إلى حد كبير.

وبالنسبة للأغراض الصناعية فإنه يلزم أن تكون الزيوت أو الدهون ذات محتوى عالٍ من أحماض دهنية مفردة لا مثيل لها أو غير عادية، أو ذات محتوى جديد من تلك الأحماض (جدول ١٨-١)، وجميعها أمور يصعب تحقيقها بوسائل التربية الكلاسيكية، لعدم توفرها - أصلاً - فى الأصول الوراثية المتاحة، إذ لا تتوفر سوى فى أنواع لا تُستأنس كمحاصيل زيتية، أو لا تهجن مع الأنواع المزروعة من المحاصيل الزيتية. هذا . بينما يمكن تحقيق ذلك بوسائل الهندسة الوراثية بزيادة أو خفض التعبير الخاص ببعض الإنزيمات.

جدول (١٨-١): بعض الاستعمالات الخاصة للأحماض الدهنية والزيوت (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

نوع الدهن	مثال	المصدر	الاستعمالات
سلسلة متوسطة الطول (C_8-C_{14})	Lauric acid	Palm kernel, coconut, *Cuphea*	المنظفات
سلسلة طويلة (C_{22})	Erucic acid	Rapeseed, *Crambe*	الشحوم - النيلون - اللدائن
Epoxy	Vernolic acid	Soybean, *Veronia*	اللدائن
Hydroxy	Ricinoleic acid	Castor bean, *Lesquerella*	الأغطية - الغلفات
Trienoic	Linolenic acid	Flax	الغلفات - المجففات
Low melting solid	Cocoa butter	Cocoa bean	الشيكولاتة - مستحضرات التجميل
Wax ester	Jojoba oil	Jojoba	الشحوم - مستحضرات التجميل

وقد تبين لدى حصر عشرات الآلاف من الأنواع النباتية أن ٩٥٪ من كل الزيوت النباتية تتكون من ستة أحماض دهنية فقط. وعلى الرغم من ذلك فإنه يعرف أكثر من ألف من التراكيب المختلفة للأحماض الدهنية، يوجد معظمها فى النباتات غير المستأنسة وقد وجدت لبعض من تلك الأحماض الدهنية استعمالات صناعية خاصة

بها، علمًا بأن بعضها يتواجد فى نباتات مستأنسة وبعضها الآخر فى نباتات برية غير مستأنسة. وباستعمال تقنيات الهندسة الوراثية يمكن نقل الجينات المسئولة عن تمثيل تلك الأحماض الدهنية من الأنواع غير المستأنسة إلى الأنواع المحصولية التى نعرف جيدًا كيف نقوم بإنتاجها ونستفيد منها، وذلك بدلاً من محاولة استئناس نباتات برية.

ويعد نبات الخروع *Ricinus communis* مثالاً لما يمكن عمله فى هذا المجال. ينمو هذا النبات بريًا فى عديد من الأنحاء، ولكنه يزرع تجاريًا على نطاق ضيق فى الهند. تحتوى بذور هذا النبات على أربعة مركبات سامة للإنسان، هى: lectin سام، ومركب يسبب حساسية شديدة، ومركب قلوانى (ألكالويدى) سام، وزيت يحتوى على ٩٠٪ ricinoleic acid، وهو المعروف بتأثيره المسهِّل الشديد. وبخلاف معظم الأحماض الدهنية. تحتوى السلسلة الهيدروكربونية للـ ricinoleic acid على مجموعة هيدروكسيل وكذلك على رابطة غير مشبعة. ويتضمن الاستعمال الصناعى لزيت الخروع تصنيع النيلون، وتصنيع الشحوم، والسوائل الهيدروليكية، والبلاستك، ومستحضرات التجميل.

وحتى إذا ما استئنست النباتات لأجل زيادة إنتاجها من الزيت فإننا سنواجه بما تحتويه بذور النبات من مركبات سامة. ولقد أظهر البحث العلمى أن إنزيما واحدًا فى بذور الخروع يعمل على تحويل حامض أمينى عادى – هو حامض الأوليّك oleic acid – إلى هذا الحامض غير العادى ricinoleic (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

ومن بين حالات التحول الوراثى التى استهدفت إحداث تغييرات فى نوعيات الدهون فى النباتات – لكل من الأغراض الغذائية والصناعية – ما يلى:

١ – أمكن تحويل لفت الزيت وراثيًا لأجل إنتاج حامض اللوريك lauric acid. وهو ذو ١٢ ذرة كربون، ويستعمل فى إنتاج الصابون والمنظفات الصناعية. وقد تحقق ذلك بواسطة شركة كال جين Calgene فى صنف تجارى أطلق عليه اسم Laurical، وقد حُصِلَ على الجين اللازم لذلك من شجرة California bay، وهو جين يقوم بوضع نهاية لتمثيل الأحماض الدهنية بعد تكوينها لإثنتى عشرة ذرة كربون بدلا من ثمانى عشرة ذرة من السلسلة الطبيعية للأحماض الدهنية بهذا النبات، وذلك دون التأثير على إنتاج

النبات من الدهون. وقد وصلت نسبة حامض اللوريك فى بعض سلالات لفت الزيت التى حولت وراثيًا إلى نحو ٤٠٪ من محتواها من الزيت.

٢ – كذلك تمكنت كالجين من تحويل لفت الزيت وراثيًا بالجين C8/C10 thioestrase، حيث احتوت السلالات المنتجة على أحماض دهنية ذات سلاسل متوسطة الطول (8:0 أو 10:0) بنسبة وصلت إلى ٢٨٪ فى الزيت، مع انخفاض مماثل فى محتوى الزيت من الأحماض الدهنية الطويلة (C18)، مثل: حامض اللينوليك Linoleic acid، وحامض اللينولينك Linolenic acid (عن Williamson ٢٠٠٢).

٣ – يتميز زيت نبات لسان الثور borage (وهو *Borago officinalis*) باحتوائه على حامض جاما لينوليك gama-linoleic بنسبة ٢٥–٤٠٪، بينما ليس لهذا الحامض وجود فى زيت لفت الزيت. ولقد أمكن بنقل الجين Δ6-desaturase من لسان الثور إنتاج نباتات محولة وراثيًا من لفت الزيت تحتوى على ٢٠,٨٪ حامض أوليك oleic، و ٢٣,٤٪ حامض لينوليك linoleic، و ٤٣٪ حامض جاما لينوليك.

٤ – أدى التعبير عن جين الإنزيم thioestrase (TE) من النبات الاستوائى جوز جندم mangosteem (وهو: *Garcinia monostana*) فى لفت الزيت إلى تراكم حامض الاستياريك stearic به بنسبة ٢٠٪.

٥ – استخدمت الهندسة الوراثية – كذلك – فى تغيير طول سلسلة الأحماض الدهنية، ومن الأمثلة على ذلك أن التعبير عن جين الإنزيم TE من نبات California bay (وهو: *Umbellularia californica*) – الذى يحتوى على ٧٠٪ حامض لوريك lauric فى زيته – التعبير عنه فى *Arabidopsis thaliana* رفع نسبة تراكم الأحماض الدهنية المتوسطة الطول (١٢ ذرة كربون) به إلى ٢٥٪.

٦ – أمكن من خلال التعبير المعاكس anti-sense expression للـ Δ9-stearoyl-ACP-desaturase زيادة كمية حامض الاستياريك إلى نحو ٤٠٪ من المحتوى الكلى من الأحماض الدهنية فى لفت الزيت (عن Weber وآخرين ٢٠٠١).

٧ – أمكن زيادة مستوى الدهون ذات الأحماض الدهنية الـ monounsaturated،

بهدف تحسين قيمتها الغذائية وقد تحقق ذلك بتحويل التبغ وراثيًا بجين desaturase حُصِل عليه من الفئران، حيث أدى إلى زيادة مستويات كلا من حامضى الباليتوليك palmitoleic acid (وهو (16:1)، والأوليك oleic acid (وهو 18:1) (عن Chawla ٢٠٠٠)

تحسين محتوى الفيتامينات

فيتامين أ (وكذلك الكاروتينات والزانثوفيللات بصورة عامة)

يُعد المسار الكاروتينى الأيضى من المسارات الأساسية فى النباتات التى تقود إلى إنتاج مجموعتين من المركبات: الكاروتينات carotens، والزانثوفيللات xanthophylls. وتقود سلسلة جانبية من هذا المسار إلى إنتاج الهرمون سيتوكينين cytokinin الذى يتم عن طريق الإنزيم isopentenyl transferase

تعد الكاروتينات من أهم الصبغات فى عديد من الثمار والخضروات، كالطماطم، والبقدونس، والبرتقال وغيرهم. وفى الطماطم يكون مرد اللون الأحمر إلى صبغة الليكوبين lycopene ومن بين أكثر من ٦٠٠ من المركبات الكاروتينية التى تتكون بصورة طبيعيه فى النباتات، فإن ثلاثة منها فقط لها نشاط فيتامين أ، وهى: الـ α-carotene، والـ β-carotene، والـ ε-carotene وتلك الكاروتينات، إضافة إلى γ-carotene، والكاروتينات الليكوبين، والليوتين lutein – وهى التى لا تتحول إلى فيتامين أ – يعتقد بأنها توفر حماية للجسم من الإصابة ببعض أنواع الأمراض السرطانية، مثل سرطان الثدى، وسرطان الرحم، وسرطان البروستاتا كذلك ترتبط الكاروتينات باستجابة مناعية للجسم تحمى الجلد من الأشعة فوق البنفسجية. وبالإضافة إلى ذلك فإنها توفر حماية ضد الأكسدة لإنزيمات الكبد التى تعرف باسم glutathione Phase II detoxification enzymes، وبذا . فهى تُسهم فى التخلص من الملوثات والسموم التى قد تتواجد فى الجسم.

أما المجموعة الثانية من الكاروتينات – الزانثوفيللات – فإن منها – كذلك – مركبات ذات خصائص بيولوجية إيجابية، مثل الـ canthaxanthin (يوفر حماية من الأشعة فوق

البنفسجية)، والـ cryptoxanthin، والـ zeaxanthin، والـ astaxanthin. ويبدو أن هذه المركبات توفر حماية لفيتامين أ وفيتامين E ومركبات كاروتينية أخرى. ومثلما عليه الحال مع الكاروتينات، يبدو أن الزانثوفيللات تكون فعالة فى أنسجة خاصة، فمثلاً يُعتقد بأن الـ cryptoxanthin يوفر حماية لأنسجة الرحم

ولقد أطلق على الكاروتينات عدة أسماء تصف مصدرها البيولوجى وأهميتها الغذائية والصحية والطبية، مثل الأسماء: phytochemicals، و phytonutrients، phytofoods، و functional foods.

وعلى سبيل المثال فإن تثبيط فعل الإنزيم phytoene synthase الذى يعمل على إنتاج الكاروتين الأول فيتوين phytoene ربما يؤدى إلى إنتاج طماطم بدرجات مختلفة من اللون الأصفر وفى الجانب الآخر. فإن التعبير الزائد بصورة غير عادية لهذا الإنزيم قد يؤدى إلى إنتاج طماطم أكثر أحمرارًا وأكثر قيمة فى محتواها من الكاروتينات (عن Wehling ٢٠٠٠).

ومن أبرز جهود الهندسة الوراثية لتحسين مستوى الكاروتينات النشطة بيولوجيًا كفيتامين تلك التى بُذلت لأجل إنتاج أرز غنى بفيتامين أ، أو ما أصبح يعرف بالأرز الذهبى golden rice

يعد الأرز من أهم المحاصيل الغذائية فى عديد من دول العالم، وخاصة فى جنوب وجنوب شرق آسيا

وعلى الرغم من أن الغلاف الثمرى الخارجى للأرز يعد غنيًا فى الفيتامينات، والزيوت، وبعض العناصر، إلاّ أنه يتم التخلص منه أثناء عملية ضرب الأرز وتلميعه، علمًا بأن الحبة يجب أن تلمع بعد إزالة الغلاف الخارجى لأن الزيوت المتبقية سريعا ما تتزنخ، مما يفقد حبة الأرز صلاحيتها للاستعمال كغذاء. هذا .. ولا يحتوى الإندوسبرم المتبقى بعد ذلك على فيتامين أ أو أى من المركبات التى يتكون منها الفيتامين، مثل البيتاكاروتين، كما لم يكتشف أى جيرمبلازم من الأرز يحتوى على صبغات صفراء من تلك التى يتكون منها فيتامين أ فى الإنسان والحيوان

ولقد أمكن التعبير عن بادئ فيتامين أ (البيتاكاروتين) فى الأرز بتحويله وراثيًا بالجين phytoene desaturase من البكتيريا *Erwinia uredovora*، والجينين phytoene synthase والـ lycopene β-cyclase من النرجس البرى daffodil. (وهو *Narcissus pseudonarcissus*). وكما كان متوقعًا اكتسب إندوسبرم الأرز لونًا أصفر واحتوى على كميات متباينة من البيتا كاروتين (بادئ فيتامين أ) بالإضافة إلى نوعين آخرين من المركبات الكاروتينية، هما: اللوتين lutein، والزيازانثين zeaxanthin، اللذان يلعبان دورًا فى تقليل ظهور البقع الجلدية المتغيرة اللون لدى المرضى المتقدمين فى العمر

تُحمل هذه الصفة فى صنف الأرز TP 309، وهو صنف لم يلق - بكل أسف - أية قبول من قبل منتجى الأرز على المستوى العالم كله؛ مما يعنى ضرورة نقل تلك الصفة بطرق التهجين والانتخاب إلى سلالات أرز أخرى أكثر قبولاً، أو محاولة إنتاج سلالات أخرى محولة وراثيًا تكون أفضل من سابقتها، هذا بالإضافة إلى ضرورة توعية مستهلكى الأرز بالقيمة الغذائية للأرز الذهبى اللون (عن Zeigler ٢٠٠١).

فيتامين إى أو هـ (E)

تعرف التوكوفيرولات tocopherols (وهى دهون ذائبة) - مجتمعة - باسم فيتامين إى vitamin E، وهى من مضادات الأكسدة الهامة، وتتوفر فى بعض الزيوت، مثل زيت فول الصويا، وزيت الذرة، وزيت اللفت، ويؤدى تواجدها بصورة أكبر من حاجة الجسم إلى تقليل مخاطر أمراض الشرايين التاجية، وإلى زيادة القدرات المناعية للجسم، وتأخير الشيخوخة التى تظهر كنتيجة لحدوث تدهور تدريجى فى مختلف وظائف الأعضاء

ونجد فى معظم البذور الزيتية أن التوكوفيرول الرئيسى هو الـ γ-tocopherol وهو قليل النشاط - نسبيًا - كبادئ للـ α-tocopherol الذى يعد الصورة النشطة لهذا الفيتامين ويتطلب تحول γ-tocopherol إلى α-tocopherol إضافة مجموعة مثيل ($-CH_3$)، وقد تمكن الباحثون من عزل جين يشفر لإنزيم مسئول عن هذا التفاعل (تفاعل المثلمة methylation reaction) فى الأنسجة النباتية الخضراء وبتزويد الجين بـ

promoter خاص بالبذور ونقلهما إلى النبات التجريبي *Arabidopsis thaliana* أمكن إنتاج نباتات كان فيها ٩٥٪ من التوكوفيرول على الصورة النشطة، مع زيادة مقدارها ٨٠٪ في محتواها من فيتامين E النشط (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

تحسين محتوى الحديد

ترجع مشكلة نقص الحديد في غذاء الإنسان في الدول النامية إلى عاملين، هما:

١ - انخفاض محتوى معظم الأغذية من العنصر، وخاصة الأرز الذي يعد أهم محصول غذائي في عديد من دول العالم، وخاصة في جنوب وجنوب شرق آسيا

٢ - ضعف امتصاص الإنسان للعنصر الذي يحصل عليه من مصادر نباتية

وبينما نجد في الدول المتقدمة أن معظم مصادر الحديد هي حيوانية الأصل (heme iron) وسريعة الامتصاص، كما في اللحوم، والبيض، فإن معظم ما يتناوله فقراء العالم الثالث من حديد يوجد في صورة نباتية تكون ضعيفة الامتصاص وتلك الصورة النباتية (nonheme iron) يضعف امتصاصها بفعل حامض الفيتيك phytic acid، وهو مركب تخزين فوسفوري يتواجد في إندوسبرم الحبوب النجيلية وبذور البقوليات هذا بالإضافة إلى أن الأغذية التي تحفز امتصاص الحديد ذات الأصل النباتي - كالفاكهة والخضر الورقية - لا تكون عادة متاحة بوفرة في الدول النامية، إلا أن امتصاص ذلك الحديد يمكن تحسينه باستهلاك الإنسان لكميات إضافية من الببتيدات الغنية في السيستين cystein-rich peptides كذلك فإن توافر البيتا كاروتين في غذاء الإنسان يحفز امتصاص الحديد ذات الأصل النباتي

ولقد حاول علماء الهندسة الوراثية البناء على تلك الحقائق لأجل إنتاج أرز يكون أكثر محتوى من الحديد، ويكون ما به من العنصر أكثر صلاحية للامتصاص، فجَرَت محاولات في الاتجاهات التالية:

١ - إنتاج أرز محول وراثيًا بجين حُصل عليه من البقوليات يشفر لتمثيل البروتين فرّيتين ferritin الذي يحتوي على الحديد.

٢ - نقل جين يتحكم في الإنزيم المقاوم للحرارة فيتيز phytase، الذي يقوم بتحليل

حامض الفيتيك، وذلك من الفطر *Asperigillus fumigatus*، وجين البيتا جلوكانيز β-glucanase من الشعير الذى يحدد موضع الفيتيز فى الأبوبلاست apoplast

٣ – التعبير عن الزائد عن البروتين الغنى بالسيستين: الميتالوثايونين metallothionein.

٤ – تلقيح سلالات الأرز الغنية بالحديد مع تلك الغنية بالبيتا كاروتين، لإنتاج سلالات غنية فى كليهما، لأجل تحفيز امتصاص الحديد (عن Zeigler ٢٠٠١)

التحول الوراثى لتحسين صفات الجودة فى بعض الخضر الثمرية

تحسين القدرة التخزينية لثمار الطماطم، وما يرتبط بذلك من صفات ثمرية أخرى

يؤثر تحسين القدرة التخزينية لثمار الطماطم إيجابيًا فى عدد من صفات الجودة الثمرية الأخرى؛ الأمر الذى قد يحدث بصورة مباشرة أو غير مباشرة، والذى يتوقف على الاستراتيجية التى تتبع لأجل تحسين القدرة التخزينية، وهى التى تعتمد جميعها على خاصية تأخير اكتمال نضج الثمار

أخذت عملية تعديل جينات الطماطم التى تتحكم فى نضج الثمار اتجاهين. اتجاه نحو خفض إنتاج الثمار ذاتها من الإثيلين، الذى يعد الأساس الفسيولوجى لعملية النضج، واتجاه آخر لتأخير فقد الثمار لصلابتها فى المراحل الأخيرة من النضج.

أولاً: استراتيجية خفض إنتاج الثمار من الإثيلين

تنتمى الطماطم إلى مجموعة الثمار الكلايمكتيرية، مثل التفاح، والكمثرى، والقاوون، والموز، وهى التى ينطلق منها الإثيلين ذاتيًا فى بداية مرحلة اكتمال التكوين ولهذا الهرمون – الإثيلين – تأثيرات عديدة، منها كسر سكون البذور، وتحفيز النضج، وذبول الأوراق وسقوطها، وذبول الأزهار.

يتم تمثيل الإثيلين من أكثر المركبات البادئة شيوعًا، وهو S-adenosylmethionine (اختصارا SAM)، وهو الذى يتكون بكل من الميثونين methionene والـ ATP ويكون

تمثيل الإثيلين فى خطوتين محددتين يتحكم فيهما جينات مختلفة. يتحكم إنـزيم الـ ACC synthase (اختصـارًا: ACS) فـى تحويـل SAM إلى 1-aminocylopropane-1-carboxylate (اختصـارًا: ACC)، وهـو الـذى يتحـول بواسـطة إنـزيم ACC oxidase (اختصارًا: ACO) إلى إثيلين. وفى جميـع النباتـات التـى درسـت حتـى الآن .. يُشـفَر لـ ACS بعائلة مركبة من الجينات المتعددة. وفى الطماطم - على سـبيل المثـال - يوجـد ما لا يقل عن ١٠ جينات تشفر لـ ACC synthases مختلفة، وهذه الجينات على درجة عالية من التنظيم، ويستحث كل منها على العمل بطريقة مختلفة تحت مؤثرات داخلية تطورية أو خارجية بيئية. ويوجد جينان مـن الــ ACS مسئولين عـن تمثيـل إنـزيم الــ ACS الذى يتكون أثناء نضج ثمار الطمـاطم. ويـتم تنظـيم عمـل هـذه الجينـات إيجابيًّـا بواسطة الإثيلين. وهذا التنظيم يفسر عملية تزايد تمثيل الإثـيلين أثنـاء نضـج الثمـار، إذ يؤدى تمثيل قدر ولو ضـئيل مـن الإيـثلين إلى حـدوث زيـادة كـبيرة وسـريعة فـى إنتـاج الهرمون عند بداية النضج. ويبدو أن عملية تمثيل الـ ACC هى أكثـر الخطـوات تنظيمًـا فى تمثيل الإثيلين. كذلك فإن الـ ACO يُنَظِّم تمثيله إلى حـد مـا - حيـث يحـث إنتـاج الإثيلين - ولكنه لا يبدو مُحَدِّدًا لإنتاجه فى الظروف الطبيعية.

ونظرًا لأن أى نقص فى نشـاط أى مـن الإنـزيمين ACC synthase، و ACC oxidase يقود تلقائيًّا إلى نقص فى إنتاج الإثيلين .. لذا كان الاتجاه نحو تثبيط عملهما باسـتخدام الشفرة المعاكسـة، (أو بالتثبيط المشترك cosuppression).

كذلك يمكن وقف نشـاط الجينـات التـى تلعب دورًا فى تمثيل الإثـيلين بطريقـة بديلـة تتضمن التعبير عن جـين يشـفر للإنـزيم ACC deaminase. يقـوم هـذا الإنـزيم بتحليـل ACC إلى الحامض α-ketobutyric acid، وهو المادة التى تتكون منها الأحماض الأمينيـة ذات السلاسل المتفرعة. وكان هذا الجين قد عُزِلَ أصلاً من أنواع مـن الجـنس البكـتيرى *Pseudomonas* (مثل: *P. chloraphis*) عزلت من التربة. وعند التعبير عن هـذا الجـين فى النباتات يتنافس الإنزيم مع الـ ACO على الـ ACC، فإذا ما تواجدت كميـة كافيـة من الـ ACC deaminase، فإن كميات الـ ACC التى تتراكم بالنبات تقل كثيرًا عما فـى الحالات العادية. يعمل هذا الإنزيم على فتح حلقة الـ ACC cyclopropane، لإنتاج الــ

α-ketobutyrate وفـي هـذه الحالـة .. فـإن بـادئ الإثـيلين ACC يختفـي مـن المسـار الأيضـي، مما يضعف إنتاج الإثيلين بشدة.

وفي اتجاه بديل .. نجح الباحثون في تحويل الطماطم وراثيًّا بجـين غريـب عنهـا، مثل الجين S-adenosylmethionine hydrolase (اختصـارًا AdoMet hydrolase) الذى عُزِلَ – أصلاً – من البكتيريوفاج تى ٣ bacteriophage T3. يقوم هذا الإنـزيم (AdoMet hydrolase) بتحويـل SAM إلى كـل مـن methylthiodenosine، و homoserine. ولقـد عبّرت ثمار نباتات الطماطم المحولة وراثيًّا عن SAMase خلال مختلف مراحـل النضـج وكانت قدرتها على إنتاج الإثيلين منخفضـة.

وبذا .. فإن أهم الجينات التى تُستهدف للحد مـن إنتـاج الإثـيلين بالثمـار، هـي مـا يلي:

AdoMet synthetase
N-ACC malonyltransferase
ACC synthase
ACC oxidase
ACC deaminase

(عن Good وآخرين ١٩٩٤، و Wehling ٢٠٠٠، و Klee & Clark ٢٠٠٢).

ولقـد أمكـن وقـف التعـبير عـن أى مـن الإنزيمـات: ACC synthase، أو ACC oxidase، أو phytoene synthase فى نباتات الطماطم المحولـة وراثيًّـا باسـتعمال تقنيـة الشفرة المضادة antisense technology، وتبين ثبات وراثة الصفات المنقولة في النباتـات التى حولت وراثيًّا.

إن التحويـل الـوراثى للطمـاطم باسـتخدام أى مـن Antisense ACC synthase، أو Antisense ACC oxidase يُحدث بها تثبيطًا لهذين الإنزيمين وتُظهر بطئًا فـى كـل من النضج وفي الوصول إلى مرحلة ما بعد النضج. كذلك تُظهر النباتـات المحولـة وراثيًّـا بالــ Acc oxidase antisense تـأخيرًا فـى شـيخوخة الأوراق (عـن Grierson & Fray ١٩٩٤).

وقد أنتج صنف الطماطم المعدل وراثيًا Freshworld Farms Endless Summer (فى عام ١٩٩٥)، حيث تمت هندسته وارثيًا بالتثبيط المزدوج cosuppression لجين ACC synthase، مما أدى إلى زيادة فترة احتفاظ الثمار بجودتها لمدة ٣٠–٤٠ يومًا بعد الحصاد، علمًا بأن هذه الثمار تنضج بصورة طبيعية إذا ما عوملت بالإثيلين من مصدر خارجى (عن Wehling ٢٠٠٠)

ثانيًا: استراتيجية إبطاء فقد الثمار لصلابتها

بالنسبة للاتجاه نحو تأخير فقد الثمار لصلابتها فى المراحل الأخيرة من النضج ركز العلماء على تثبيط عمل الإنزيمات التى تقوم بتحليل المكونات الخلوية المسئولة عن صلابة الثمار، مثل السيليلوز، والهيمى سيليلوز، والبكتينات. ومن بين إنزيمات الـ pectinase التى تعمل على البكتينات الإنزيم: بولى جالاكتورونيز polygalacturonase (اختصارا PG)، الذى يقوم بتحليل الروابط α-1,4 فى حامض البولى جالاكيترونك polygalacturonic acid فى الجدر الخلوية. وهذا الإنزيم يتم تمثيله – خاصة – أثناء النضج، حيث يطلق فى المسافات بين خلايا الجدار الثمرى (البيريكارب pericarp) وتعد وظيفة إنزيم الـ PG – أثناء النضج الطبيعى للثمار – تحليل بكتين الصفيحة الوسطى بين خلايا الجدر الثمرية، مما يؤدى إلى فقد الثمار لصلابتها.

ومن أشهر حالات تثبيط تحليل البكتين بالهندسة الوراثية تثبيط جين الإنزيم PG باستخدام تقنية الشفرة المعاكسة (الرنا المعاكس للشفرة antisense-RNA technique)، وهى التى استخدمت فى إنتاج صنف الطماطم FlavrSavr

ومن بين الاتجاهات الأخرى التى طبقت فى ذات المجال (تقنية الشفرة المعاكسة) تثبيط الإنزيم pectin methylesterase (الذى يلعب دورًا فى تحلل البكتينات)، والإنزيم 1,4-β glucanase (الذى يعتقد بأنه يلعب دورًا فى طراوة الثمار لما يعرف عنه من تحليله للهيمى سيليلوز الرئيسى xyloglucan) (عن Wehling ٢٠٠٠).

إن من أبرز مزايا الجين المعاكس للشفرة أنه يمنع التعبير عن تكوين إنزيم البولى

جـالاكتورونيز polygalacturonase، ويبطئ من عملية فقد الثمار لصلابتها، ويمنع وصولها إلى مرحلة زيادة النضج يكون نشاط إنزيم البولى جالاكتورونيز فى ثمار النباتات الحاملة لهذا الجين منخفضا جدًا أو معدوما، ويكون فقدها لصلابتها بطيئًا جدًا. وتستخدم تلك التقنية – حاليًا – على نطاق واسع فى إنتاج أصناف جديدة يمكن حصاد ثمارها بعد اكتمال تلوينها – حيث تكون أكثر جودة – مع استمرار احتفاظها بقدرتها على تحمل التداول والتخزين

ومن الأمثلة البارزة على التطبيق التجارى لتلك التقنية صنف الطماطم FlavrSavr الذى يحتوى على الـ antisanse construct للجين الخاص بتكوين الإنزيم بولى جلاكتورونيز، والذى كان أول صنف تجارى يُنتج بالاعتماد على تلك التقنية، وأول صنف لمحصول غذائى ينتج بطريق الهندسة الوراثية (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

وتُظهر النباتات التى تتلقى نسختان من جين الـ polygalacturonose antisense مستويات من البولى جالاكتورونيز تبلغ حوالى ١٪ من المستوى الطبيعى، كما تنخفض فيها – كذلك – كل الصور الشبيهة isoforms للإنزيم، وتكون غالبية نسبة الـ ١٪ المتواجدة فى صورة polygalacturonase 1، بينما لا يحدث فيها أى انخفاض فى مستوى الـ polyuronides الذائبة، إلاّ أن أوزانها الجزيئية تزداد (عن Grierson & Fray ١٩٩٤)

حالة الطماطم فلافرسافر:

كان صنف الطماطم FlavrSavr أول غذاء محول وراثيًا يعرض للبيع للجمهور (وذلك فى ٢١ مايو ١٩٩٤)، بعد اعتماد إدارة الغذاء والدواء Food and Drug Adminstration الأمريكية له فى ١٨ مايو ١٩٩٤، وهو صنف محول وراثيًا باستعمال مضاد شفرة جين البولى جالاكتورونيز antisense polyglacturonase gene ولقد أنتج هذا الصنف بهدف حصاد الطماطم وهى مكتملة النضج – دون أن تفقد صلابتها – ومن ثم تكون أفضل طعما وهذا الجين (جين الـ polyglacturonase) عزل من الطماطم، ثم أعيد إليها فى وضع الشفرة المضادة antisense orientation

يعد البولى جالاكتورونيز هو الإنـزيم الرئيسـى فـى عمليـة أيـض البكـتين أثنـاء نضـج الثمار، وهو يرتبط بفقد الثمار لصلابتها ويؤدى استعمال الشفرة المضادة لهذا الجين فـى تحويل النباتات وراثيًا إلى تقليـل التعـبير عـن جـين البـولى جـالاكتورونيز فـى الطمـاطم ويتسبب فى تقليل ذوبان البكتين فى الثمار أثناء نضجها، الأمر الذى يؤدى إلى احتفـاظ الثمار المكتملة النضج بصلابتها لفترة طويلـة، كمـا يسـمح بـإجراء عمليـة الحصـاد بعـد اكتمال نضج الثمار على عروشها، الأمر الذى يزيد من جودتها.

ولقد أنتجت أولى سـلالات الطمـاطم المحولـة وراثيًـا باسـتعمال polygalacturonase antisense construct أخذ الرمز *p*CGN 1416.

وتبين أن غياب إنزيم بولى جالاكتورونيز فى نباتات الطماطم المحولـة وراثيًـا يكسـب الثمار قدرة على البقاء بحالة جيدة وصلبة عند تأخير الحصاد حتى اكتمال التلوين، كما يزيد من مقاومتها لبعض الفطريات التى تصيب ثمار الطماطم – عادة – بعد الحصـاد.

وبالنسـبة للثمـار المنتجـة لغـرض التصـنيع أدى غيـاب التعـبير عـن إنـزيم البـولى جالاكتوررنيز فيها إلى حدوث تحسن جوهرى فى قوام العصير ولزوجته

وفيما عدا ذلك .. لم تختلف النباتات المحولة وراثيًا عـن نظيراتهـا العاديـة فـى أى من الصفات البستانية الأخـرى، وذلـك فـى عديـد مـن الاختبـارات الحقليـة والمعمليـة فباستثناء تأثير الـ antisense gene على تركيـب البكـتين فـى الثمـرة لم تظهـر لـه أيـة تأثيرات على محتوى الثمار من الفيتامينـات والعناصـر المغذيـة، والتومـاتين tomatine، والطعم، ورقم الحموضة pH، والحموضة المعايرة، واللون، والحجم، والقدرة على التـأقلم والمنفسة تحت الظروف الطبيعية ... إلخ (جدول ١٨-٢).

كذلك ثبت أن ثمار الطمـاطم FlavrSavr ليسـت معرضـة لأيـة إصـابات غـير عاديـة بالأمراض أو الآفات، ولا تشكل أية خطورة على البيئة.

وتحتوى نباتات هذا الصنف على تتابعات نيكليوتويدية معينة تم إدخالها فى الهيئة الكروموسومية للطماطم من خلال الناقلات الثنائية التكوين *p*CGN1547: binary vectors،

أو *p*CGN1548، أو *p*CGN1549، أو *p*CGN1557، أو *p*CGN1558، أو pCGN1559، أو *p*CG1578 بالإضافة إلى جين الـ antisense polygalacturonase، مع الـ promoter، والـ terminator الخاصين به (عن Kramer & Redenbaugh ١٩٩٤).

جدول (١٨-٢): المحتوى الغذائى لثمار صنف الطماطم **Flavr Savr** مقارنة بالمدى الطبيعى ومحتوى سلالات الشاهد غير المحولة وراثيًا (عن **Kramer & Redenbaugh** ١٩٩٤)

المحتوى	المدى الطبيعى للطماطم	المدى المقدر للسلالات المحولة وراثيًا	المدى المقدر لسلالات الشاهد	وحدة القياس
البروتين	٠,٨٥	٠,٧٥-١,١٤	٠,٥٣-١,٠٥	جم
فيتامين أ	١٩٢-١٦٦٧	٣٣٠-١٦٠٠	٤٢٠-٢٢٠٠	وحدة دولية
الثيامين (ب١)	١٦-٨٠	٣٨-٧٢	٣٩-٦٤	ميكروجرام
الريبوفلافين (ب٢)	٢٠-٧٨	٢٤-٣٦	٢٤-٣٦	ميكروجرام
فيتامين ب٦	٥٠-١٥٠	٨٦-١٥٠	١٠-١٤٠	ميكروجرام
فيتامين جـ	٨,٤-٥٩	١٥,٣-٢٩,٢	١٢,٣-٢٩,٢	مجم
حامض النيكوتينك (النياسين)	٠,٣-٠,٨٥	٠,٤٣-٠,٧٠	٠,٤٣-٠,٧٦	مجم
الكالسيوم	٤,٠-٢١	٩-١٣	١٠-١٢	مجم
المغنيسيوم	٥,٢-٢٠,٤	٧-١٢	٩-١٣	مجم
الفوسفور	٧,٧-٥٣	٢٥-٣٧	٢٩-٣٨	مجم
الصوديوم	١,٢-٣٢,٧	٢-٥	٢-٣	مجم
الحديد	٠,٢-٠,٩٥	٠,٢-٠,٤١	٠,٢٦-٠,٤٢	مجم

تأثير التحول الوراثى لزيادة القدرة التخزينية على الصفات الثمرية الأخرى

يلخص جدول (١٨-٣) التأثيرات التى يُحدثها تثبيط فعل بعض الجينات المؤثرة فى نضج ثمار الطماطم وزيادة قدرتها التخزينية على الصفات الثمرية الأخرى.

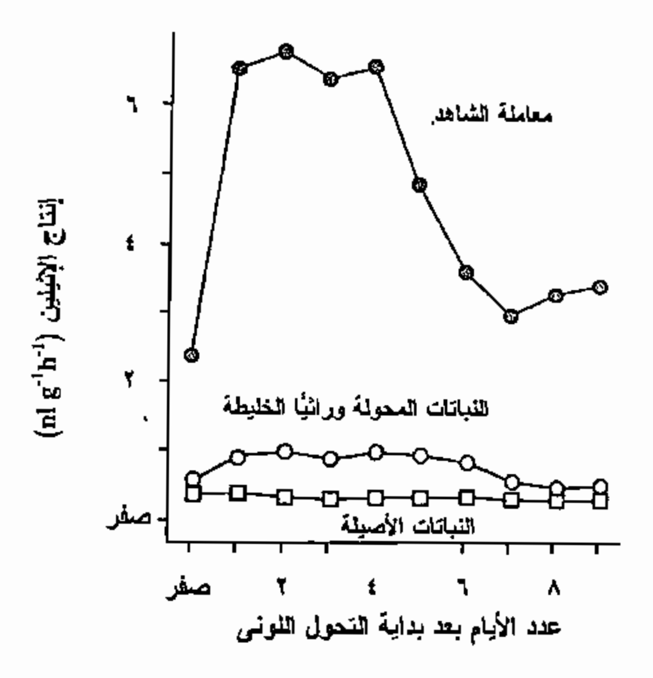
وفى أشكال (١٨-١) إلى (١٨-٣) يظهر تأثير التحولات الوراثية على عدد من الصفات؛ فيوضح شكل (١٨-١) تأثير التحول الوراثى بالشفرة المضادة للـ ACC

oxidase على إنتاج الثمار من الإثيلين، وفى شكل (١٨-٢) يظهر تأثير التحول الوراثى بالجين ذاته على تكوين الصبغات بالثمار. أما شكل (١٨-٣) فيظهر فيه تأثير التحول الوراثى بالشفرة المضادة للـ polygalacturonase على نشاط الإنزيم بالثمار خلال مراحل نضجها (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

جدول (١٨-٣): التأثيرات التى يُحدثها تثبيط فعل بعض الجينات المؤثرة فى نضج ثمار الطماطم (عن Grierson & Fray ١٩٩٤).

الجين	الوظيفة	التحسُّن
Polygalacturonase	الجدر الخلوية	زيادة القدرة التخزينية (تحسين الطعم كتأثير غير مباشر) تحسين خصائص التصنيع زيادة القدرة على مقاومة أعفان الثمار أثناء التخزين
Pectinestrase	الجدر الخلوية	تحسين خصائص التصنيع
Phytoene synthase	المواد الكاروتينية	تحسن (فيتامين أ)
ACC oxidase	C_2H_4	التحكم فى النضج، ومنع زيادة النضج، وزيادة القدرة التخزينية، وخفض خسائر التخزين
ACC synthase	C_2H_4	التحكم فى النضج، ومنع زيادة النضج، وزيادة القدرة التخزينية، وخفض خسائر التخزين

ولقد كان عصير ثمار الطماطم المحولة وراثيًا بالشفرة المعاكسة للـ polygalacturonase أكثر لزوجة (معبرًا عن ذلك بمسافة انسياب العصير فى وحدة الزمن) عن عصير الطماطم غير المحولة، علمًا بأن نشاط البولى جالاكتورونيز فى ثمار تلك النباتات كان أقل من ١٪ من النشاط الطبيعى له فى الثمار غير المحولة وراثيًا فى جميع مراحل نضج الثمار. وعلى الرغم من أن صلابة تلك الثمار لم تختلف عما فى الكنترول، إلا أن قدرتها التخزينية وقدرتها على تحمل النقل دون أن تحدث بها أضرار كانت أفضل (Schuch وآخرون ١٩٩١).

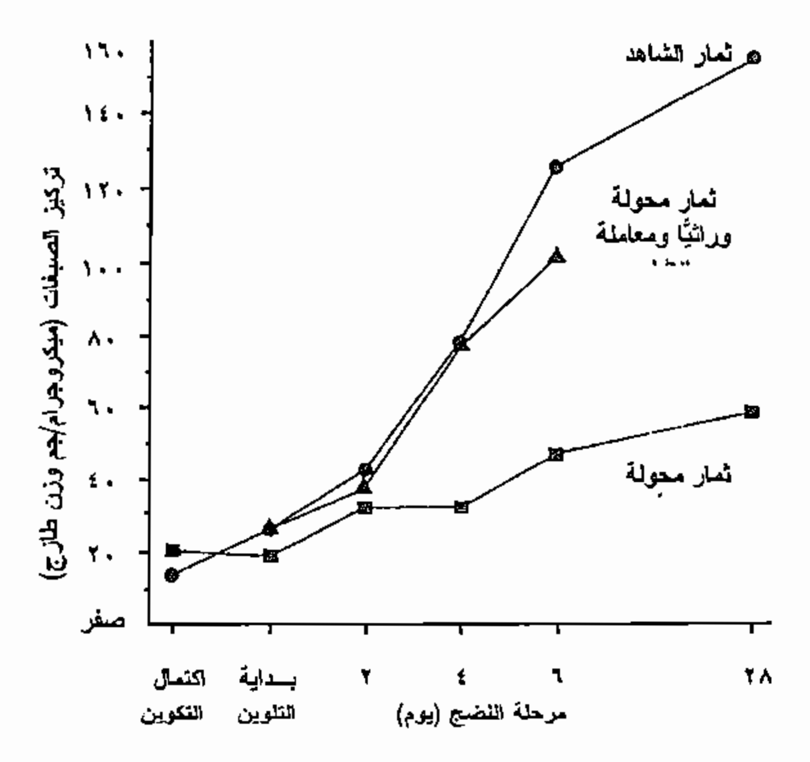


شكل (١٨-١): إنتاج الإثيلين فى ثمار الطماطم المحولة وراثيًا بالـ antisense ACC oxidase construct. يلاحظ أن الزيادة الكبيرة التى تحدث فى إنتاج الثمار غير المحولة وراثيًا (معاملة الشاهد) تنخفض بشدة فى الثمار التى تحمل جين antisense واحد (الخليطة وراثيًا)، وتنعدم تقريبًا فى النباتات المحولة وراثيًا الأصيلة التى تحمل جينين antisense.

تحسين القدرة التخزينية لثمار الكنتالوب (القاوون)، وما يرتبط بذلك من صفات ثمرية أخرى

اتبعت مع الكنتالوب استراتيجية خفض إنتاج الإثيلين بالثمار مثلما اتبعت مع الطماطم. وذلك بهدف زيادة قدرتها التخزينية؛ فقد تمكن Ayub وآخرون (١٩٩٦) من إنتاج كنتالوب شارانتيه يعبر فيه عن الشفرة العكسية لجين الإنزيم ACC oxidase، وهو الإنزيم الذى يُتِّم الخطوة الأخيرة فى عملية تمثيل الإثيلين، وذلك بتحول 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (اختصارًا: ACC) إلى إثيلين. ولقد وجد أن إنتاج الإثيلين فى ثمار النباتات المحولة وراثيًا يقل عن ٠,٥٪ من إنتاجه فى ثمار النباتات العادية غير المحولة وراثيًا، كما توقفت فى هذه الثمار عملية النضج تمامًا قبل

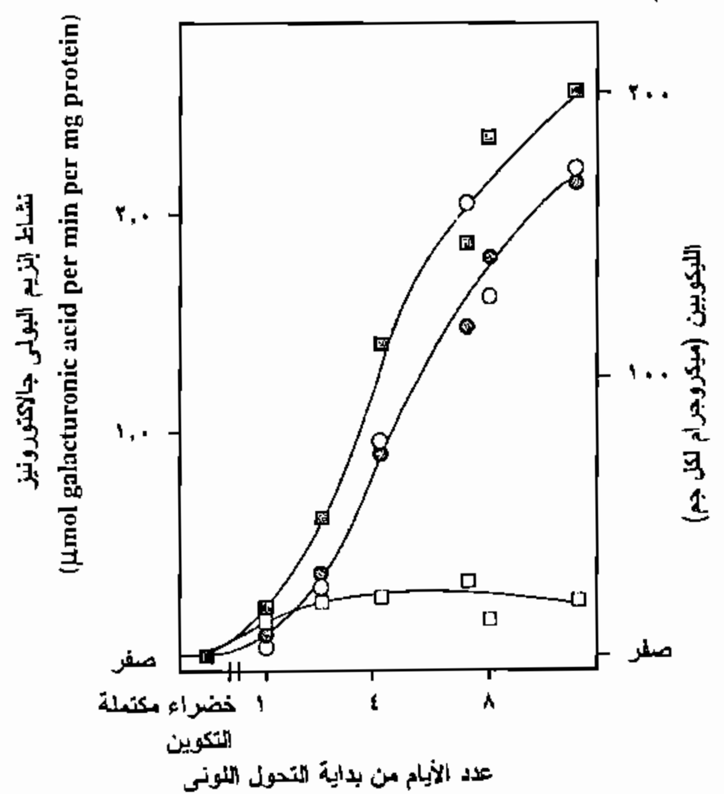
القطف وبعده، وأمكن وقف هذا التأثير - واستكمال الثمار لنضجها - بمعاملتها بالإثيلين. ويمكن إجراء هذه المعاملة قبل الوقت المتوقع لاستهلاك الثمار بفترة قصيرة؛ مما يعنى إمكان احتفاظ الثمار بقدرتها التخزينية وصفاتها الجيدة لفترة طويلة.



شكل (١٨-٢): تكوين الصبغات فى ثمار الطماطم المحولة وراثيًا بالـ antisenic ACC oxidase construct. يلاحظ أن معدل تكوين الصبغات فى الثمار التى قطفت فى مرحلة اكتمال التكوين وهى خضراء انخفض بشدة مقارنة بما حدث فى ثمار الشاهد غير المحولة وراثيًا، بينما استعادت الثمار المحولة وراثيًا قدرتها على تكوين الصبغات عندما عوملت بمصدر خارجى للإثيلين

وقد أوضحت الدراسات أن نباتات الكنتالوب شارانتيه المحولة وراثيًا والتى تحمل الشفرة العكسية للجين ACC oxidase (وهى التى تنتج ثمارها الإثيلين بمعدل يقل عن ٥٠٪ من المعدل الطبيعى) أوضحت الدراسات أنها لم تُظهر أى من أعراض أضرار البرودة (تكون النقر السطحية والتلون البنى بالقشرة) لدى تخزينها على ٢°م لمدة ٣-٤ أسابيع، على عكس الحال فى ثمار النباتات التى لم تحول وراثيًا. كما تبين أن منع

إنتاج الإثيلين في ثمار النباتات العادية بمعاملتها - قبل وصولها إلى مرحلة الكلايمكتيرك - بالمركب 1-methylcyclopropene منع - كذلك - ظهور أعراض أضرار البرودة ولقد كانت القدرة على تحمل البرودة في ثمار النباتات المحولة وراثيًا مصاحبة بالفشل في تراكم الإيثانول والأسيتالدهيد، وبعدم حدوث أى تدهور في الأغشية الخلوية أثناء التخزين البارد. كذلك أدت معاملة ثمار النباتات المحولة وراثيًا بالإثيلين قبل تعريضها للحرارة المنخفضة إلى حدوث زيادة في ظهور أعراض أضرار البرودة (Ben Amor وآخرون ١٩٩٨)



شكل (١٨-٣): نشاط إنزيم البولى جالاكتورونيز galacturonase، ومحتوى الثمار من الليكوبين أثناء النضج في نباتات الطماطم المحولة وراثيًا بالـ antisense polygalacturonase construct تظهر في الشكل مقارنة بين نشاط الإنزيم (المربعات السوداء) ومحتوى الليكوبين (الدوائر السوداء) في الثمار المحولة وراثيًا، مقارنة بنشاط الإنزيم (المربعات البيضاء) ومحتوى الليكوبين (الدوائر البيضاء) في الثمار غير المحولة. يلاحظ أن جين التحول الوراثي يخفض بشدة نشاط إنزيم البولى جالاكتورونيز، ولكنه لا يؤثر على تراكم تكوين الليكوبين.

وأمكن الاستفادة من نباتات كنتالوب الشارانتيه المحولة وراثيًّا - والتي يثبط فيها إنتاج الإثيلين بشدة - باستخدامها كنموذج للتمييز بين مسارات النضج الأيضية التي تنظم بواسطة الإيثلين وتلك التي لا تنظم. ولقد وجد أنه - مقارنة بثمار النباتات غير المحولة وراثيًّا - لم يظهر بثمار النباتات المحولة وراثيًّا اصفرار خارجي، أو طراوة بلبها هذا إلا أن تلك التأثيرات انعكست تمامًا لدى معاملة الثمار المحولة وراثيًّا بالإثيلين بتركيز ٥٠ ميكروليتر/لتر. وقد تلون لب الثمار مبكرًا قبل بداية الكلايمكتيرك؛ وبذا .. فإن اللون الداخلي للثمار لم يتأثر بتثبيط إنتاج الإثيلين في الثمار المحولة وراثيًّا. كذلك تراكمت المواد الكلية الصلبة الذائبة بنفس المعدل في كل من الثمار المعدلة وراثيًّا وغير المعدلة حتى اليوم الثامن والثلاثين بعد التلقيح، حينما بدأت الثمار غير المعدلة في الانفصال هذا .. إلاّ أن الثمار - ومع تكون طبقة انفصال في أعناق الثمار المحولة وراثيًّا التي ثُبِّطَ فيها إنتاج الإثيلين - استمرت متصلة بالنبات، مما أدى إلى زيادة محتواها من السكريات، وخاصة السكروز. وقد أدى حصاد الثمار المحولة وراثيًّا إلى إنتاجها لكميات صغيرة - ولكن معنوية - من الإثيلين الداخلي الذي ارتبط بفقد الثمار لصلابتها (Guis وآخرون ١٩٩٧).

تحسين بعض صفات الجودة الأخرى في ثمار الطماطم

قد تتحقق زيادة في محتوى ثمار الطماطم من السكريات - وخاصة الجلوكوز والفراكتوز - بزيادة محتواها من إنزيم الإنفرتيز invertase الذي يقوم بتحويل سكر السكروز إلى مكوناته الأصلية من الجلوكوز والفراكتوز. يحدث هذا التحول مع بداية نضج الثمار، وهو الوقت الذي يتوقف فيه - تقريبًا - تخزين السكروز في الثمار وبدء تمثيل الإنفرتيز. وقد اقترح أن الهندسة الوراثية باستعمال إنزيم الإنفرتيز يمكن أن تسرع من معدل انتقال السكروز من النبات إلى الثمار، ومن تحويله إلى جلوكوز وفراكتوز.

كذلك وجد أن تثبيط التعبير عن الإنزيم pectin methyl esterase - وهو الذي يلعب دورًا في عملية تحلل الجدر الخلوية - وذلك باستعمال (شفرته العكسية) - أدى إلى زيادة محتوى الثمار من المواد الصلبة الذائبة بنسبة حوالي ١٥٪ دون التأثير على أي من

محصول الثمار أو النمو الخضرى للنبات، إلاّ أنه قلل قليلاً من القدرة التخزينية للثمار. ولا شك أن المواد الصلبة الزائدة التى تتراكم فى تلك الحالة تختلف كليًا عن تلك التى تتراكم فى حالات النضج الطبيعى للثمار.

وتبين أيضًا أن التعبير عن الجين المسئول عن تكوين الإنزيم ADP-glucose pyrophosphorylase فى ثمار الطماطم بطرق الهندسة الوراثية أدى إلى زيادة محتوى الثمار من النشا بدرجة قليلة، إلا أنها كانت كافية لإحداث زيادة هائلة فى درجة لزوجة العصير

ولاشك أن تربية الطماطم بطرق الهندسة الوراثية يمكن أن تلعب دورًا هامًا فى زيادة صلاحية الطماطم لصناعة المعجون (الصلصة) والكِتشب

ولقد أدت زيادة التعبير عن الإنزيم phytoene synthase إلى إعادة اكتساب طفرات الطماطم الصفراء الثمار القدرة على إنتاج الكاروتين وإلى تحسين اللون فى الأصناف الأخرى (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

التحول الوراثى لتحسين صفات الجودة فى أزهار الزينة

لعل أهم الصفات التى تتبادر إلى الذهن عند ذكر صفات الجودة فى أزهار الزينة هو ألوانها، وأشكالها، ومدى قدرتها على الاحتفاظ بنضارتها بعد القطف، وهى الأمور التى حازت باهتمام الباحثين فى مجال الهندسة الوراثية

التحكم فى لون الأزهار

إن أهم الصبغات التى تتحكم فى لون الأزهار هى الفلافونات flavonoids (مسار الـ shikimate الأيضى)، والكاروتينات carotenoids (مسار الـ isoprenoid لأيضى)، والبيتالينات betalains وأهم الفلافونات المسئولة عن اللون، هى الأنثوسيانينات anthocyanins التى تتحكم فى اللونين الأحمر والأزرق وببين شكل (١٨-٤) جانب من لمسرات الأيضية التى تؤدى إلى تكوين بعض الصبغات الأنتوسيانينية.

4-coumaroyl-CoA + 3 x malonyl-CoA
CHS
Naringenin-chalcone
CHI
Naringenin
F3H
DFR
ANS/3GT
Dihydrokaempferol
Leucopelargonidin
Pelargonidin-3-glucoside
Brickred/orange
F3'H
Dihydroquercetin
Leucocyanidin
Cyanidin-3-glucoside
Red
F3'5'H
Dihydromyricetin
Leucodelphinidin
Delphinidin-3-glucoside
Purple

Anthocyanin synthesis pathway. (CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone flavanone isomerase; F3H, flavaonoe-3-hydroxylase; F3'H, flavonoid-3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid-3', 5'-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol-4-reductase; ANS anthocyanidin synthase; 3GT, UDP-flavonol 3-O-glucosyltransferase.)

شكل (١٨-٤): المسارات الأيضية التى تؤدى إلى تمثيل بعض الصبغات الأنثوسيانينية (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

يلاحظ فى الشكل أنه عند أكثر من موضع فى المسارات يمكن أن تحدث تحورات فى المركبات المتكونة من خلال نشاط الإنزيمات dihydroflavonol-4-reductase

(اختصارًا: DFR)، و anthcyanidin synthase (اختصارًا: ANS)، و UDP-flavonol 3-O-glucosyltransferase (اختصارًا: 3GT)، مما يؤدى إلى تمثيل صبغات بألوان مختلفة (البرتقالى والأحمر والأزرق)

هذا إلاّ أن بعض تلك الإنزيمات لا تتواجد فى بعض الأنواع النباتية، ومن ثم يستحيل على تلك الأنواع تمثيل بعض الألوان فى أزهارها. ولقد أمكن من خلال الجمع بين التربية بالطفرات والهندسة الوراثية إنتاج نباتات قادرة على تمثيل صبغات لم تكن قادرة على تمثيلها من قبل. وعلى سبيل المثال .. فإن البيتونيا لا يمكنها إنتاج الصبغات ذات الصلة بالبلارجونيدين pelargonidin (الأحمر الطوبى/البرتقالى) نظرًا لأن إنزيمها DFR لا يمكنه العمل على المركب dihydrokaempferol. هذا .. إلاّ أنه أمكن التعرف على طفرة من البيتونيا فى الجينين favonoid-3′-hydroxylase (اختصارًا F3′H)، و flavonoid-3′,5′-hydroxylase (اختصارًا: F3′5′H). هذه الطفرة لم تكن قادرة على العمل على المركب dihydrokaempferol فى الأجزاء الأخرى من المسارات، مما أدى إلى تراكمها ولقد أمكن تحويل هذه السلالة الطفرية وراثيًّا بجين الذرة DFR، مما مكن النباتات من العمل على الـ dihydrokaempferol وتحويله إلى الصبغة ذات اللون الأحمر الطوبى pelargonidin-3-glucoside، مما سمح بإنتاج بيتونيا ذات أزهار حمراء طوبية اللون (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

إن أحد أهداف المشتغلين بالهندسة الوراثية فى مجال تحسين نباتات الزهور هو إنتاج أزهار ذات لون أزرق فى الأنواع التى لا تنتج بطبيعتها أزهارًا بهذا اللون، مثل الورد والقرنفل ولقد وجد أن الأنثوسيانين دِلفنيدين delphinidin هو المسئول عن إنتاج هذه الصبغة الزرقاء كما أسلفنا، وأمكن بالفعل عزل جين من البيتونيا *Petunia hybrida* مسئول عن التشفير للإنزيم 3′,5′-hydroxylase الضرورى لتمثيل الدلفنيدين ونقله إلى الورد وعلى الرغم من أهمية ذلك الأمر إلاّ أن ظهور الصبغات الزرقاء يتوقف على الرقم الأيدروجينى فيما بين الخلايا intracellular pH، وهو أمر يتحكم فيه عدد من الجينات الأخرى (عن Woodson ١٩٩٧)

وفى استراتيجية أخرى تم الإخلال بالمسار الأيضى الموجود بالفعل فى البيتونيا عن طريق تقنية الشفرة المضادة، حيث استعمل الجين CHS - فى شفرته العكسية - فى تحويل البيتونيا وراثيًا. أظهرت تلك النباتات شفرة الـ CHS المضادة، وهى التى تفاعلت مع الشفرة العادية للجين، مما أدى إلى تعطيل مسار الأنثوسيانين؛ وترتب على ذلك إنتاج أزهار بلون أقل دكنة تدرجت حتى اللون الأبيض (عن Swarup & Swarup ١٩٩٣).

ولقد تمكنت بعض الشركات، مثل Florigene من إجراء تحولات وراية فى المسار الأيضى لتمثيل الأنثوسيانين فى نباتات، مثل: الورد، والقرنفل carnation، والأقحوان chrysanthemum، والجربارة gerbera، مما مكنها من إنتاج أزهار فى المجال اللونى الأزرق (الموف - البنفسجى - الأزرق). وهذه النباتات لا يمكنها - بطبيعتها - إنتاج الأنثوسيانين ديلفينيدين delphinidin؛ نظرًا لأنها لا تحتوى على الإنزيم F3'5'H ولقد قامت الشركة بعزل هذا الجين ونقله إلى تلك الأنواع الزهرية، مما سمح بإنتاج أزهار زرقاء اللون منها. وكان أول الأصناف التجارية التى أنتجت وعرضت للبيع صنف القرنفل Moondus ذو الأزهار الموف اللون، وذلك فى عام ١٩٩٦ (عن Slater وآخرون ٢٠٠٣).

التحكم فى شكل الأزهار

يحاول الباحثون فى مجال الهندسة الوراثية تغيير شكل الأزهار، وذلك كما فى كل من: الخَطْم *Antirrhinum majus*، والـ *Petunia*، والـ *Arabidopsis*، حيث تعرف طفرات تؤثر على كل من سيمترية (تساوق أو تماثل أو تناظر) الأزهار وتكوين مختلف الأعضاء الزهرية. وأمكن - على سبيل المثال - عزل الجينين deficiens، و globosa من الأنترهينم، وهما يحولان البتلات إلى تراكيب سبلية (عن Swarup & Swarup ١٩٩٣).

تحسين قدرة الزهور على الاحتفاظ بنضارتها بعد القطف

تعرف المدة التى تحتفظ خلالها أزهار الزينة بنضارتها بعد القطف باسم vase life، وهى مدة تتأثر بعملية التلقيح التى تُنشِّط عددًا من التغيرات الفسيولوجية فى الزهرة، تقود فى نهاية الأمر إلى شيخوختها وذبولها وسقوطها إن لم تكن قد قطفت بعد. ويعد الإثيلين هو الهرمون النباتى الرئيسى الذى يتحكم فى تلك التغيرات وفى القرنفل carnation يتحكم فى شيخوخة البتلات مجموعتين من الجينات، ينظِّم نشاط إحداها الإثيلين ويمكن إيقافها بالمعاملة بمثبطات الإثيلين، ولا تُنَظمُ الأخرى بفعل الإثيلين، ولا يمكن وقفها بالمعاملة بمثبطات الإثيلين.

ويتضمن تمثيل الإثيلين تحويل المركب S-adenosylmethionine إلى 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid (اختصارًا: ACC) بالإنزيم ACC synthase، وتحويل ACC إلى إثيلين بواسطة الإنزيم ACC oxidase. ولقد أمكن عزل كلا الإنزيمين ACC synthase، و ACC oxidase، وبذا أمكن التحكم فى إنتاج الإثيلين، ومن ثم فترة حياة الأزهار.

وعلى سبيل المثال أمكن فى القرنفل استعمال cDNA معزول للإنزيم ACC oxidase فى إنتاج قرنفل محول وراثيًا يُظهر الشفرة العكسية لهذا الجين (antisense ACC oxidase). ولقد كانت الأزهار التى أنتجتها تلك النباتات ذات مستوى منخفض للغاية من الإثيلين وازداد عمرها بعد القطف إلى أكثر من ٢٠٠٪.

وفى منحىً آخر يحاول الباحثون إطالة فترة حياة الأزهار بمنع حدوث التلقيح فيها من الأساس؛ الأمر الذى يتحقق بجعلها عقيمة الذكر، وهو ما تستخدم فيه تقنيات الهندسة الوراثية كذلك (عن Swarup & Swarup ١٩٩٣، و Woodson ١٩٩٧)

الفصل التاسع عشر

الهندسة الوراثية للتحكم فى نمو وتطور النباتات ولأهـداف أخـرى زراعية وبيئية و بية وصناعية

نستعرض فى هذا الفصل جهود الهندسة الوراثية التى بذلت لأجل تحقيق أهداف زراعية أخرى – غير تلك التى أسلفنا بيانها فى الفصول السابقة – مثل التحكم فى نمو وتطور النباتات، وكذلك الجهود التى استهدفت تحويل بعض النباتات والكائنات الدقيقة وراثيًا لخدمة أغراض بيئية، وطبية، وصناعية.

التحول الوراثى لأجل التحكم فى نمو وتطور النباتات

التحكم فى تمثيل الهرمونات النباتية

غنى عن البيان أن الهرمونات النباتية الطبيعية هى المسئول الأول عن تنظيم عمليات النمو والتطور الطبيعية، وأن أى تحولات وراثية تؤدى إلى زيادة تمثيل أى منها – أو الحد منها – يترتب عليها تغيرات كبيرة فى النمو والتطور النباتى الطبيعيين.

ولقد تمكن الباحثون من تحديد هوية عديد من الجينات التى تؤثر فى إنتاج الهرمونات النباتية وعزلها واستخدامها فى عمليات التحول الوراثى. ويبين جدول (١٩–١) قائمة بتلك الجينات، ومصادرها، ونشاطها الإنزيمى، وتأثيراتها على مختلف الهرمونات سلبًا أو إيجابًا.

وقد قدمنا فى الفصل الثامن عشر عديدًا من الأمثلة على التحكم فى إنتاج الإثيلين بهدف زيادة قدرة الثمار والأزهار على الاحتفاظ بجودتها بعد القطف.

ونقدم فيما يلى – مزيدًا من الأمثلة على التحكم فى تمثيل الهرمونات، وما يستتبع ذلك من تغيرات:

● قام الباحثون بتعديل نظام التعبير عن السيتوكينين فى النبات، وهو الهرمون الذى

جدول (١٩-١) الجينات التى استخدمت فى عمليات التحول الوراثى للتحكم فى إنتاج الهرمونات النباتية الطبيعية (عن Herbers & Sonnewald ١٩٩٨)

الهرمون	الجين	تأثير الجين على الهرمون	النشاط الإنزيمى
ABA	Anti-ABA antibodies	تثبيط فعل الهرمون	Binding of single chain antibodies to ABA
Auxin	*Pseudomonas syringae iaa*L	وقف نشاط الهرمون	Conjugates IAA to Lys
	Arabidopsis nitrilase II	زيادة تمثيل الهرمون	Converts indole-3-acetonitrile to IAA
	*A. tumefaciens iaa*M	زيادة تمثيل الهرمون	Converts Trp to IAM
	*A. tumefaciens iaa*M + *iaa*H	زيادة تمثيل الهرمون	Converts Trp to IAM
	*A. rhizogenes rol*B	زيادة الحساسية للهومون	Hydrolyses indoxyl glucosides (in vitro)
Cytokinin	*A. tumefaciens ipt*	وقف نشاط الهرمون	Condensates IP-PP to AMP
	*A. rhizogenes rol*C	تغيير شامل فى الهرمون	Hydrolyses cytokinin glucosides (in vitro)
Ethylene	*Pseudomonas* ACC deaminase	تثبيط تمثيل الهرمون بتغيير المسار	Converts ACC to a-ketobutyric acid
	Tomato ACC oxidase	منع تمثيل الهرمون بالشفرة العكسية	Blocks conversion of ACC to ethylene
	Tomato ACC synthase	منع تمثيل الهرمون بالشفرة العكسية	Blocks conversion from SAM to ACC
	T3 SAM hydrolase	تثبيط فعل الهرمون	Converts SAM to MTA and homoserine
Jasmonic acid	Flax aos	زيادة تمثيل الهرمون	Converts hydroperoxide to allene epoxide
	Arabidopsis LOX II	التثبيط المشترك Co-suppression	Reduced formation of jasmonic acid
Salicylic acid	*Pseudomonas putida nah*G	وقف نشاط الهرمون	Hydroxylates salicylic acid to catechol
systemin	Tomato prosystemin	منع تمثيل الهرمون بالشفرة العكسية	Reduced formation of systemin
	Tomato prosystemin	زيادة التعبير عن الهرمون	Increased formation of systemin

ABA, abscisic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; AMP, adenosine monophosphate; aos, allene oxide synthase; IAA, indole-3-acetic acid, iaaH, indoleacetamide hydrolase; iaaL, indoleacetic acid-lysine synthetase; iaaM, tryptophan monooxygenase; IAM, indoleacetamide; IP-PP, isopentenyl pyrophosphate; ipt, isopentenyltransferase; LOX, lipoxygenase; Lys, lysine; MTA, methylthioadenosine; SAM, S-adenosyl methionine; Trp, tryptophan.

يعتقد بأنه يلعب دورًا فى تحفيز تجميع المركبات الأيضية فى الأنسجة الحديثة التى لها صلة بعملية التكاثر الجنسى، مثل الثمار. ومن المعروف أن الإنزيم isopentenyl transferase يقوم بتكوين بادئ السيتوكينين isopentemyl AMP من سلسلة فرعية فى المسار الكاروتينى. ولقد قام الباحثون بربط جين الـ isopentenyl transferase (الذى يعطى الرمز ipt) مع promoter خاص بمبيض الزهرة فى الطماطم؛ مما أدى إلى زيادة مستويات السيتوكينين فى مبايض الأزهار؛ ومن ثم زيادة جاذبية الثمرة لنواتج البناء الضوئى من مواد كلية صلبة ذائبة، وزيادة فى نسبة ما تحتويه من سكريات إلى أحماض، إلاّ أن ذلك كان على حساب المحصول الكلى للثمار الحمراء، ومتوسط وزن الثمرة (Martineau وآخرون ١٩٩٥، وعن Wehling ٢٠٠٠).

• أمكن نقل جين الذرة UDPG-transferase إلى البطاطس. وأدت عملية التحول الوراثى تلك إلى زيادة تمثيل إندول حامض الخليك عما فى نباتات البطاطس غير المحولة وراثيًا، وإلى زيادة معدل استطالة النباتات وإنتاجيتها. ويبدو أن نقل الجينات التى تحسن من وضع الأوكسين فى النبات يؤدى إلى زيادة المستوى الطبيعى الأمثل من الأوكسين إلى حدٍ أعلى (Rekolavskaya وآخرون ١٩٩٩)

• أدى تحويل الطماطم وراثيًا بالشفرة المعاكسة لجين الـ ACC oxidase إلى تثبيط فعل هذا الإنزيم ووقف إنتاج الإثيلين، مما أدى إلى تأخير شيخوخة الأوراق لبعض الوقت، ولكنها لم تبق خضراء اللون بصورة دائمة، فما أن بدأت فيها مرحلة الشيخوخة حتى استمرت بصورة طبيعية (John وآخرون ١٩٩٥)

تحسين القدرة على البناء الضوئى

اتخذت جهود التحولات الوراثية لتحسين القدرة على البناء الضوئى اتجاهين، هما التأثير فى مسارات البناء الضوئى ذاتها، وتأخير شيخوخة الأوراق التى تقوم بعملية البناء الضوئى

التأثير فى مسارات البناء الضوئى

أمكن تحويل الطماطم وراثيًا بجين الذرة sucrose-phosphate synthase (اختصارًا SPS)، وأدى هذا التحول الوراثي إلى زيادة تمثيل الكربون إلى سكروز بنسبة ٥٠٪، وقلل من محددات عملية البناء الضوئى التى تحدث بفعل تراكم نواتج تلك العملية كذلك كانت النباتات المحولة وراثيًا أبكر فى الإزهار، وازداد عدد العناقيد الزهرية فيها جوهريًا عما كان عليه الحال فى النباتات العادية غير المحولة وراثيًا، عندما كان نموها فى تركيز ٣٥ أو ٦٥ باسكال من ثانى أكسيد الكربون وفى تركيز ٣٥ باسكال كان عدد الثمار الكلى فى النباتات المحولة وراثيًا ١,٥ مثل عدد الثمار فى نباتات الكنترول، وكان نضج ثمارها أسرع وازداد الوزن الجاف الكلى لثمارها بنسبة ٣٢٪ كذلك انخفض معدل إصابة ثمار النباتات المحولة وراثيًا بتعفن الطرف الزهرى (Micallef وآخرون ١٩٩٥)

وأمكن زيادة القدرة على البناء الضوئى فى الأرز (وهو نبات ذو مسار C3 فى البناء الضوئى) بتحويله وراثيًا بجينى الذرة (وهو نبات ذو مسار C4 فى البناء الضوئى). phosphoenolpyruvate carboxylase (اختصارًا PEPC)، و pyruvate orthophosphate dikinase (اختصارا PPDK) ولقد أظهرت النباتات المحولة وراثيًا – كذلك – مستوى أقل من التنفس الضوئى photorespiration، وتركيزًا أعلى من ثانى أكسيد الكربون بالأوراق (عن Zeigler ٢٠٠١)

تأخير شيخوخة الأوراق وسقوطها

اتجه تفكير الباحثين نحو إنتاج نباتات محولة وراثيًا تحتوى على الـ SAG12 promoter (وهو جين لا ينشط إلاّ مع بدء مرحلة الشيخوخة) مع جين الأجروباكتيريم ipt المسئول عن تمثيل السيتوكينين فمع بدء وصول الأوراق إلى مرحلة الشيخوخة يبدأ عمل الجين ipt، مما يؤدى إلى زيادة مستوى السيتوكينين بها، الأمر الذى يؤخر اكتمال الشيخوخة، فيستمر احتفاظ الأوراق بمحتواها الكلوروفيلى، ومن ثم تستمر عملية البناء الضوئى هذا إلاّ أنه لا يعرف على وجه التحديد مدى نجاح تلك الاستراتيجية، إذ

إن النيتروجين الذى ينطلق من الأوراق التى تدخل فى مرحلة الشيخوخة يلزم فى عمليات حيوية أخرى، مما يجعل من غير المحتمل أن يكون بقاءه فى الأوراق مفيدًا

وفى منحىً آخر اتجه الباحثون نحو تأخير سقوط الأوراق، بهدف تمديد فترة الاستفادة منها. إن تكوين طبقة الانفصال التى تؤدى إلى سقوط الأعضاء النباتية تكون مصاحبة بتحلل للجدر الخلوية فى طبقة الخلايا التى يحدث عندها الانفصال. وفى الطماطم .. يرتبط الانفصال المستحث بواسطة الإثيلين بزيادة فى نشاط إنزيمى البولى جالاكتورونيز، والسليوليز (وهو: endo-β-1,4-D-glucanase). ولقد أمكن عزل جين من الطماطم يفترض أنه بولى جالاكتورونيز يُعبر عن ذاته أثناء عملية الانفصال، وأعطى الرمز pTAPGI. ويعتقد أن التعرف على هذا الجين وعزله يمثل أداة إضافية تساعد فى دراسة عملية الانفصال وما يحدث فيها بصورة أفضل (Kalaitzis وآخرون ١٩٩٥)

التحكم فى إنتاج الفيتوكروم

تتجه النباتات تحت تأثير الأشعة تحت الحمراء (الأمر الذى يحدث عندما تتعرض النباتات للتظليل من النباتات المجاورة لها) . تتجه نحو الاستطالة الكبيرة لتجنب التظليل ولقد تمكن العلماء من إنتاج نباتات تبغ محولة وراثيًا يزداد فيها كثيرًا التعبير عن الجين المسئول عن تكوين الفيتوكروم أ phytochrome A الذى يقوم بتثبيط عملية تجنب الظل، أى يقوم بتثبيط استطالة النباتات فى ظروف الإضاءة الضعيفة. ولا شك أن هذا الجين يمكن أن يكون له دور كبير فى تطوير شتلات لا تستطيل سيقانها سريعًا فى المشاتل (وهو الأمر الذى يستلزم – أحيانًا – الحد من استطالتها بمعاملتها بمثبطات النمو)، وكذلك فى تطوير نباتات للزراعات المحمية – كالطماطم والخيار والفاصوليا – لا تستطيل سلامياتها بسرعة كبيرة؛ الأمر ذات الأهمية الاقتصادية الكبيرة فى الزراعات المحمية (عن Woodson ١٩٩٧).

وقد أثبت Jackson وآخرون (١٩٩٦) أن الفيتوكروم بى phytochrome B ينظم عملية تحكم فترة الإضاءة فى تكوين الدرنات فى البطاطس، وذلك من خلال تحويل البطاطس *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* – التى تحتاج إلى نهار قصير لتكوين الدرنات

– تحويلها وراثيًا بالشفرة المضادة لجين الفيتوكروم بى antisense PHYB cDNA. أدى ذلك التحول الوراثى إلى إلغاء عملية تحكم الإضاءة فى تكوين الدرنات؛ حيث تكونت الدرنات فى النباتات التى حولت وراثيًا فى كل من النهار القصير، والنهار الطويل، والنهار القصير الذى قطع فيه الليل الطويل بإضاءة لفترة قصيرة. وتعنى تلك النتائج أن فيتوكروم بى يلزم لعملية تحكم فترة الإضاءة فى تكوين الدرنات فى *S. tuberosum* subsp. *andigena*، وأنه ينظم تلك العملية بمنع تكوين الدرنات فى الفترات الضوئية غير الحاثة لتكوين الدرنات، وليس بتحفيز تكوين الدرنات فى الفترات الضوئية الحاثة لذلك.

وأدى تحويل البطاطس وراثيًا بجين phytochrome B المتحصل عليه من نبات *Arabidopsis thaliana* إلى زيادة التعبير عن الفيتوكروم بى، الذى أحدث – بدوره – عدة تأثيرات، مثل قصر النمو إلى درجة قريبة من التقزم، وضعف السيادة القمية، وزيادة عدد الأوراق الصغيرة السميكة، وزيادة تواجد الصبغات. وبسبب زيادة الكلوروبلاستيدات الخضراء فى خلايا النسيج العمادى للنباتات المحولة وراثيًا ازداد البناء الضوئى فى وحدة المساحة من الورقة وفى النبات ككل. كما كانت عملية البناء الضوئى أقل حساسية للتثبيط الضوئى فى ظروف الشدّ الضوئى لفترة طويلة. وبينما لم تتأخر بداية مرحلة الشيخوخة فى النباتات المحولة وراثيًا، فإن إبطاء تحلل الكلوروفيل أدى إلى إطالة فترة حياة النباتات النشطة فى عملية البناء الضوئى. وقد أدى كلا الأمرين (زيادة القدرة على البناء الضوئى وطول فترة حياة النبات) إلى زيادة إنتاج المادة العضوية؛ مما أحدث زيادة فى نمو الأجزاء تحت الأرضية والمحصول (Thiele وآخرون ١٩٩٩).

منع التلون البنى الإنزيمى

يعد التلون البنى الإنزيمى فى درنات البطاطس بعد الحصاد مشكلة هامّة. ولقد وجد أن تثبيط إنزيم البولى فينول أوكسيديز (الـ catechol oxidase) بالتحول الوراثى بالشفرة المعاكسة للإنزيم يوقف عملية التلون البنى الإنزيمى تلك فى سلالات البطاطس المحولة

وراثيًا (Bachem وآخرون ١٩٩٤) ومن المعتقد أن هذا الاكتشاف يمكن أن يفتح الطريق أمام عمليات تحول وراثي مماثلة في عديد من المحاصيل الغذائية التي يحدث بها تلون بني إنزيمي مماثل لدى تعرضها للتجريح

العقد البكرى للثمار

أمكن تحويل التبغ والباذنجان وراثيًا بالجين *iaa*M من البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*، مع استخدام الجين المنظم DefH9 الخاص بالبويضات والمتحصل عليه من *Antirrhinum majus*، وذلك لأجل إنتاج ثمار بكرية العقد ولقد أدى خصى أزهار النباتات التى حولت وراثيًا إلى إنتاجها لثمار بكرية، كما أنتجت ثمارًا بكرية لدى تلقيحها. وفى الباذنجان . سمحت عملية التحول الوراثى بإنتاج النباتات لثمار فى ظروف بيئية لا تناسب عقد الثمار فى النباتات غير المحولة وراثيًا، والتى لم تثمر إطلاقًا فى تلك الظروف والجدير بالذكر أنه بينما أنتجت كلا من النباتات المحولة وراثيًا وغير المحولة وراثيًا ثمارًا بحجم مناسب للتسويق فى الظروف البيئية المناسبة للعقد، فإن النباتات غير المحولة وراثيًا لم تنتج ثمارًا بحجم صالح للتسويق إلاّ بعد تلقيحها (Rotino وآخرون ١٩٩٧، وعن Bhat ٢٠٠٠)

العقم الذكرى

إن لظاهرة العقم الذكرى أهمية كبيرة فى إنتاج الهجن التجارية وقد أمكن التخلص من حبوب اللقاح بالتعبير عن إنزيمات الـ ribonucleases فى المتوك فقط، واستعمل لتحقيق ذلك إنزيم البارنيز Barnase – وهو جين يتحكم فى إنتاج أحد الـ ribonucleases خارج الخلية extracellular Rnase – من البكتريا *Bacillus amyloliquefaciens*. تستعمل هذه البكتيريا إنزيم البارنيز كنظام دفاعى ضد البكتيريا المنافسة لها كذلك تنتج البكتيريا ذاتها إنزيم البارستار Barstar الذى يعد مثبطًا خاصًا للبارنيز، والذى يمكن استعماله فى إنتاج نباتات جيل أول خصبة (عن Kempken ٢٠٠١)

وكما أسلفنا يوجد فى هذه البكتيريا (*Bacillus amyloliquifaciens*) جينًا يقوم بتحليل الرنا، يعرف باسم barnase، ولقد أمكن تحويل خلايا النسيج المغذى tapetal cells فى متوك لفت الزيت بهذا الجين؛ مما أدى إلى موتها وبغياب تلك الخلايا انعدم مصدر الغذاء الذى كان يمد الخلايا الجرثومية الصغيرة microspores باحتياجاتها منه؛ مما أدى إلى موتها وعدم تكون حبوب اللقاح. وبمعنى آخر فإن عملية التحول الوراثى تلك أحدثت عقمًا ذكريًا فى النبات. ومن ناحية أخرى فإن تلك النباتات أنتجت بذورًا حينما لُقحت بحبوب لقاح خصبة. ولكن نظرًا لأنه فى الحالات التى يكون فيها المنتج التجارى هو البذور يتعين أن يكون الجيل الأول خصبًا، لذا استعمل جين استعادة الخصوبة barstar الذى حُصِلَ عليه من البكتيريا ذاتها. يلتحم البروتين الذى ينتجه الجين barstar مع إنزيم الـ barnase ويوقف نشاطه؛ وبذا تكون الخلايا المغذية فى نباتات الجيل الأول عادية وتقوم بتغذية الخلايا الجرثومية الصغيرة بصورة طبيعية

ولأجل الإنتاج التجارى لبذور الجيل الأول الهجين تم عمل ارتباط بين جين يعرف باسم bar يكسب النباتات مقاومة لمبيد الحشائش phosphinothricin والجين barnase، وبذا أمكن بالرش بالمبيد التخلص من النسل الخصب الذكر (٥٠٪)، الذى ينتج من تلقيح السلالات العقيمة الذكر الـ hemizygous (الـ barnase) مع سلالات عادية غير محولة وراثيًا (-/-). أما الـ ٥٠٪ المتبقية من النباتات فإنها يمكن أن تستعمل فى إنتاج بذور الجيل الأول الهجين (عن Bhat ٢٠٠٠).

كذلك أمكن بنجاح تحويل بعض النباتات وراثيًّا بنقل جينات (نووية) سائدة لاستعادة الخصوبة. يعتمد هذا النظام فى الهندسة الوراثية على جين التبغ TA29 الذى يقتصر نشاطه النسخى على طبقة الخلايا المغذية Tapetal layer بالمتوك، والـ Rnase (barnase)/Rnase-inhibitor (barstar) من البكتيريا *Bacillus amyloliquefaciens* يؤدى إدخال الـ gene construct المعروف باسم -Ta29, tapetum specific promoter barnase الخاص بالـ cytotoxic protein .. يؤدى إدخال هذا الـ construct والتعبير عنه إلى إتلاف خلايا النسيج المغذى tapetum بالمتك؛ مما يمنع تكوين حبوب اللقاح

ويسبب حالة من العقم الذكرى ويؤدى إدخال الـ gene construct الخاص باستعادة الخصوبة – المعروف باسم T29, tapetum specific promototer-baraster – يؤدى إدخال هذا الـ construct فى نبات آخر إلى استعادته لخصوبته، أى يؤدى إلى إنتاج ما يعرف بالـ restorer line يُعد الـ barstar هو المثبط الخاص بالـ barnase، ويتضمن التثبيط تكوين معقد ثابت من البروتين بنسبة ١ : ١ وليس لتعبير barstar فى الأب المذكر (الخصب الذكر) أى تأثير على تطور تكوين طبقة الـ tapetum، ومن ثم يكون النبات خصبًا وبعد العقم الذكرى الذى يسببه الـ barnase صفة سائدة

يحافظ على السلالات عقيمة الذكر التى تحتوى على الـ barnase السائد (والتى يكون تركيبها الوراثى –/barnase) بتلقيحها بحبوب لقاح من نبات طبيعى خصب غير محول وراثيًا (أى يكون –/– وبدون barnase). هذا إلاَّ أن نسل التلقيح بين النباتات العقيمة (-/barnase) والنباتات الخصبة (–/–) يكون ٥٠٪ عقيمًا (–/barnase)، و ٥٠٪ خصبًا (–/–)، وتتعين إزالة النباتات الخصبة قبل إزهارها ويتم التعرف على النباتات الخصبة بربط الجين barnase بالجين bar، الذى يكسب النباتات مقاومة للمبيد الفطرى phosphinothricin، وذلك على صورة gene-construct هو barnase-bar. ومن ثم تكون النباتات العقيمة الذكر (barnase-bar) مقاونة لبيد الحشائش، بينما تكون النباتات الخصبة الذكر (–/–) حساسة للمبيد، وتموت عندما ترش به

وعندما تلقح النباتات عقيمة الذكر بنباتات بها جين استعادة الخصوبة (barstar) فإن النسل الهجين الناتج يكون حاملا لكلا الجينين، ويشكل البروتينان اللذان يعبر عنهما الجينين مركبًا معقدًا خاملاً، ومن ثم يتكون الـ tapetum بصورة طبيعية، ويكون الهجين كامل الخصوبة

وقد أنتجت بهذه الطريقة سلالات مهندسة وراثيًا من لفت الزيت والذرة لأجل الإنتاج التجارى للهجن

هذا وتعرف جينات أخرى للعقم الذكرى والخصوبة، مثل E، و BcPI، إلاَّ أنها لم تلق النجاح الذى لاقاه نظام الـ barnase-barstar (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

التحول الوراثى لأغراض المكافحة الحيوية

لا يدخل تحت موضوع التحول الوراثى لأغراض المكافحة الحيوية أى من الأمور التى سبقت لنا مناقشتها فى فصول عديدة سابقة تناولنا فيها عمليات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات، والحشرات، والنيماتودا، والفطريات، والبكتيريا التى تصيب النباتات، على الرغم من أن المقاومة الوراثية هى - بطبيعتها - مكافحة حيوية؛ فما يعنينا هنا هو عمليات التحول الوراثى التى تجرى على الكائنات الدقيقة ذاتها - المستعملة فى المكافحة الحيوية - لأجل زيادة كفاءتها

ومن بين الدراسات التى أجريت فى هذا المجال، ما يلى:

- تمكن الباحثون من إنتاج مبيدات حيوية بطرق الهندسة الوراثية اعتمدت غالبًا على نقل الجين Bt الخاص بالبكتيريا *Bacillus thuringiensis* إلى البكتيريا *Pseudomonas*، حيث تنمى البكتيريا المحولة وراثيًّا، ثم تقتل، وتعامل بها النباتات تحتوى الخلايا البكتيرية الميتة - تلك - على بروتين قاتل ليرقات حرشفية الأجنحة.

- كذلك أمكن التعبير عن الجين Bt فى كائنات تقوم - طبيعيًا - باستعمار جذور النباتات (عن Malik ١٩٩٩)

- أمكن عزل الجين chiA المسئول عن تكوين الشيتينيز chitinase الرئيسى فى البكتيريا *Serratia macescens*، ونقله إلى البكتيريا *Pseudomonas fluorescens*، التى أصبحت - بدورها - فعّالة فى المكافحة الحيوية للفطر *Rhizoctonia solani* على بادرات الفاصوليا (Downing & Thomson ٢٠٠٠).

- أمكن تحويل البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* وراثيًّا بزيادة قدرتها على إنتاج المركب 2,4-diacetyl phloroglucinol، مما جعلها أكثر كفاءة فى المكافحة البيولوجية للفطر *Pythium ultimum*، إلاّ أن ذلك كان مصاحبًا بنقص فى قدرتها على استعمار جذور النباتات، مقارنة بالطراز البرى من البكتيريا (Alsanius وآخرون ٢٠٠٢)

- يُثبط فطر الميكودرما نشاط مسببات الأمراض النباتية بوسائل متعددة، منها .

التطفل mycoparasitism، والتضادية الحيوية antibiosis، والتنافس على الغذاء. ومن بين وسائل التريكودرما فى وقف نشاط الكائنات المرضة إفرازها للمضادات الحيوية أو الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية، مثل إنزيمات: الـ chitinases، والـ β-1,3-glucanases، والـ proteases، والـ mannanases، وغيرها من الإنزيمات المحللة (عن Limon وآخرين ١٩٩٩).

ولقد أمكن تحويل السلالة CECT 2413 من *Trichodrma harzianum* وراثيًّا بالجين Chit 33 الذى يتحكم فى زيادة إنتاج الإنزيم 33-kDa chitinase، حيث وصل إنتاج السلالة المحولة وراثيًّا من الشيتينيز - عند نموها فى الجلوكوز - إلى ٢٠٠ ضعف إنتاج السلالة العادية، بينما كان إنتاج السلالتين من الشيتينيز متساويًّا عند نموها فى الشبتين وفى كلتا الحالتين كانت السلالة المحولة وراثيًّا أكثر كفاءة فى منع نمو الفطر *Rhizoctonia solani* عن السلالة العادية (Limon وآخرون ١٩٩٩)

التحول الوراثى لأجل التخلص من العناصر الثقيلة فى البيئة

تتراكم العناصر الثقيلة فى التربة والمياه بصورة متزايدة، وصلت فى حالات كثيرة إلى مستويات سامة لكل من الحياة البحرية والبرية، وانتقلت تلك السمية - بدورها - إلى الإنسان من خلال ما يتناوله فى طعامه من أغذية ملوثة، سواء أكانت من أصل نباتى، أم حيوانى ومن بين مختلف العناصر الثقيلة يعد الزئبق أحد أهم مخلفات بعض الصناعات

ولقد وجدت بعض الأنواع البكتيرية التى تتميز بدرجة عالية من المقاومة للتركيزات العالية من الزئبق، وذلك بفضل احتوائها على عدد من الجينات التى تشكل ما يعرف باسم mercury resistance operon يأخذ أحد هذه الجينات الرمز merB، وهو يشفر لإنزيم (يوصف بأنه organomercurial lyase) يقوم بتحليل الرابطة الكربونية فى الزئبق العضوى، لينتج Hg(II) ويأخذ جين آخر الرمز merA، وهو يشفر لإنزيم mercuric ion reductase يقوم - بدوره - بتحويل الـ Hg(II) إلى الزئبق العنصرى

Hg(O)، الذى يعد أقل سمية بكثير عن كل من الـ Hg(II)، و HeHg، كما أنه يتبخر من الخلايا ولهذا السبب جرت محاولات للاستفادة من هذه البكتيريا فى التخلص من تراكمات الزئبق فى التربة والمياه، إلاّ أنها لم تكن على درجة عالية من الفعلية، وكانت بطيئة إلى درجة استحالة الاعتماد عليها - بصورة تامة - فى التخلص من الزئبق المتراكم خلال فترة مناسبة.

وقد اتجه الاهتمام إلى نقل جينات المقاومة للزئبق من البكتيريا إلى النباتات، ونقل بالفعل الجين merA إلى بعض الأنواع النباتية، إلاّ أن النتائج لم تكن مشجعة، حيث لم يحدث تعبير لهذا الجين فى النباتات المحولة وراثيًا به، وبقيت النباتات حساسة للـ Hg(II)

هذا إلاّ أن عملية التحول الوراثى لمقاومة الزئبق كانت ناجحة حينما عُدِّل الجين merA جزئيًا، وذلك فى كل من *Arabidopsis thaliana*، والحور الأصفر *Liriodendron tulipifera* أنبتت بذور الـ *Arabidopsis* المحولة وراثيًا بالجين merA المعدل ونمت بادراتها بقوة وأزهرت وأعطت بذورًا فى تركيز ٢٥-١٠٠ مللى مول من الزئبق، وهو تركيز يعد - عادة - سامًا للنباتات العادية. ولقد أفرزت النباتات المحولة وراثيًا الزئبق العنصرى Hg(O) فى الهواء الجوى - عند تنميتها فى محلول مغذ غنى بالزئبق - وذلك بدرجة زادت بمقدار أربع مرات عما حدث فى النباتات العادية غير المحولة وراثيًا (عن Rugh وآخرين ١٩٩٨).

التحول الوراثى للأغراض الطبية

تعرف العديد من حالات التحول الوراثى التى استهدفت إنتاج المركبات الدوائية من هرمونات، وبروتينات، وببتيدات، ولقاحات ضد عدد من الأمراض الخطيرة التى تهدد البشرية، مثل الكوليرا والأيدز، والملاريا كما تتجه الأبحاث نحو إنتاج لقاحات يمكن أن يتناولها الإنسان فى طعامه على صورة نبات محول وراثيًا ليكون لقاحا؛ فيما يعرف باسم edible vaccines وقد حدثت تقدمات فى هذا المجال فى إنتاج لقاحات مضادة للبكتيريا *E. coli*، و *Shigella*، و *Salmonella* (عن Chawla ٢٠٠٠)

إنتاج اللقاحات

إن فكرة إنتاج البروتينات المناعية والمضادات الحيوية فى النباتات مازالت جديدة، إلاً أن التوقعات المؤملة عليها كبيرة للغاية، ويعد الغياب المؤكد للفيروسات المرضة أحد أهم الميزات التى توفرها اللقاحات التى تنتج بواسطة النباتات ولعل من أهم تطبيقات الهندسة الوراثية فى هذا المجال استخدامها فى إنتاج لقاحات ضد الالتهاب الكبدى hepatitis، والكوليرا cholera، والإسهال البكتيرى diarrhea، والبكتيريا المسببة لتسوس الأسنان، وبروتينات البويضات غير المخصبة ذات الأهمية فى منع الحمل. ويعتقد العلماء أن نبات الموز ربما كان الاختيار المثالى لإنتاج تلك اللقحات، التى يكون إنتاجها رخيصًا وآمنًا (Moffat ١٩٩٥).

إن الأجسام المضادة عبارة عن بروتينات تنتج بواسطة الجهاز المناعى للفقاريات، تقوم بالتعرف على جزيئات خاصة تسمى أنتيجينات وترتبط بها. وقد تكون هذه الأنتيجينات بروتينات، أو مواد كربوهيدراتية، أو مركبات عضوية بسيطة، أو أيونات معدنية وتستهدف الأجسام المضادة الأنتيجينات، حيث تجدها وترتبط بها، وتوقف أى تأثير يمكن أن تحدثه فى الكائن الفقارى ولذا فإن الأجسام المضادة تعد حيوية فى حماية الكائنات المنتجة لها من أى كائنات قد تصيبها

ولقد ثبت أن بالإمكان تحويل النباتات وراثيًا لإنتاج الأجسام المضادة التى تنتجها الحيوانات، وذلك بنقل الجينات المسئولة عن إنتاج الأجسام المضادة من الحيوانات إليها، وأمكن بالفعل إنتاج عديد من الأجسام المضادة، والأجسام المضاده الكيميرية (المختلفة قليلاً عن الأصلية)، وقطع من الأجسام المضادة فى نباتات مختلفة حولت وراثيًا ولقد وصل تركيز الأجسام المضادة فى النباتات المنتجة لها – فى بعض الحالات – إلى ١٪ من البروتين الخلوى الكلى ومن بين أهم الانجازات فى هذا الشأن إنتاج ما يعرف باسم Guy's 13 secretory antibody فى النباتات، وهو الجسم المضاد الذى يتعرف على البكتيريا *Streptococcus mutans* المسببة لتسوس الأسنان فى الإنسان

وتتضمن عملية التحصين vaccination إدخال مركبات أنتيجينية فى الجسم أو فى

الدورة الدموية، بهدف تحفيز الكائن المحصن لإنتاج الأجسام المضادة المقابلة لتلك المركبات الأنتيجينية، بحيث يكون الجسم مجهزًا لمحاربتها حال وصولها إليه في مرات تالية وتجرى عملية التحصين غالبًا عن طريق الدم، ولكنها قد تتم عن طريق الفم كما في حالة لقاح شلل الأطفال، ولكن التحصين عن طريق الفم أقل شيوعًا منه عن طريق الدم لاحتياج الأول لكميات كبيرة من اللقاح. ولهذا السبب اتجه الباحثون نحو إنتاج اللقاحات على نطاق واسع في النباتات التي تحول وراثيًا لهذا الغرض وفضلاً عن تواجد تلك اللقاحات في أجزاء نباتية يمكن استعمالها كغذاء، فإنها لا تتطلب عمليات استخلاص وتنقية وتخزين مبرد كما هو الحال في اللقاحات التي تنتج في مزارع الخلايا (عن Bhat ٢٠٠٠).

هذا وتتميز اللقاحات التي يمكن أن يتناولها الإنسان في غذائه المحول وراثيًا بأنها رخيصة الثمن، ويمكن إنتاجها قريبًا من أماكن التجمعات السكانية التي قد تكون في حاجة إليها، كما يمكن جعل النبات الواحد ينتج أكثر من لقاح (Tacket & Mason ١٩٩٩)

ومن أهم إنجازات الهندسة الوراثية في مجال إنتاج اللقاحات، ما يلي:

- كان أول اللقاحات التي عبر عنها في النباتات الأنتجين I/II - المتحصل عليه من *Streptococcus mutans* (يعرف بالاسم streptococcal antigen I/II) - وهو الذي وصل تركيزه إلى ٠٫٠٢٪ من البروتين الكلي بأوراق التبغ. وبالنظر إلى أن البكتيريا *S. mutans* تعد المسئول الأول عن تسوس الأسنان، فإن استعمال ذلك اللقاح قد يفيد في منع تسوس الأسنان

- كذلك أمكن التعبير عن سُم البكتيريا *E. coli* (وهو المعروف باسم heat labile entrotoxin B subunit of *E. coli*) في البطاطس، وأدت تغذية الفئران بها إلى إنتاجها للمواد المضادة لذلك السُم

- وأمكن التعبير عن الجليكوبروتين الخاص بفيرس داء الكلب rabis-virus

glycoprotein في الطماطم بتركيز منخفض لم يتعد ٠,٠٠١٪ من تركيز البروتينات الذائبة (عن Kampken ٢٠٠١).

• كذلك أمكن إنتاج بطاطس محولة وراثيًا بجين البروتين LT-B (وهو enterotoxin حساس للحرارة العالية تفرزه البكتيريا *Escherechia coli* في معدة الأفراد الذين يصابون بها). ولقد أوضحت نتائج الدراسات التي أجريت في هذا الشأن أن لقاحًا أنتيجينيًا حُصِلَ عليه من نبات بطاطس محول وراثيًا أمكن التعرف عليه من قِبلَ الجهاز المناعي للإنسان بطريقة ترتب عليها إحداث مناعة جهازية (Tacket وآخرون ١٩٩٨).

• أمكن تحويل الترمس والخس وراثيًا بجزء الدنا الذي يشفر لأنتجين فيرس الالتهاب الكبدي الوبائي بي، وأدت تغذية الفئران عليها إلى إنتاجها لمستويات عالية من الأجسام المضادة لهذا الفيرس (Kapusta وآخرون ١٩٩٩).

• كذلك أمكن إنتاج لقاح الالتهاب الكبدي الوبائي HBsAg في التبغ، وثبت أنه لم يختلف عن اللقاح المماثل الذي يُنتج بواسطة الخميرة (عن Bhat ٢٠٠٠).

• وأمكن التعبير في البطاطس عن اللاكتوفِرِّين lactoferrin الإنساني المضاد للميكروبات، وظهر نشاط مضاد للميكروبات ضد أربع سلالات بكتيرية مختلفة – من تلك التي تصيب الإنسان – في مستخلصات درنات البطاطس المحولة وراثيًا (& Chong Langridge ٢٠٠٠).

• كذلك أمكن التعبير في النباتات عن أنتيجين سُمِّ الكوليرا المعروف باسم: antigen of cholera-toxin B subunit of *Vibrio cholerae* (عن Bhat ٢٠٠٠).

• أمكن تحويل البسلة وراثيًا لجعلها مصنعًا لإنتاج الجسم المضاد scFV (اختصار للمكون single-chain Fv fragment للجسم المضاد) المستخدم في تشخيص الإصابات السرطانية وعلاجها. أنتجت النباتات المحولة وراثيًا ٩ ميكروجرامات من الجسم المضاد لكل جرام من الوزن الطازج من البذور. وقد استمر ثبات ظهور الجسم المضاد في نسل النباتات المحولة وراثيًا، كما احتفظ بنشاطه في البذور المجففة والمخزنة لمدة شهرين على حرارة الغرفة (Perrin وآخرون ٢٠٠٠).

هذا ونعرض فى جدول (١٩-٢) قائمة بأنواع الأجسام المضادة التى أمكن إنتاجها فى النباتات، وقائمة أخرى فى جدول (١٩-٣) بأمثلة لأنواع اللقاحات التى أنتجت فى النباتات، وذلك من خلال عمليات التحول الوراثى (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

جدول (١٩-٢): أمثلة لبعض أنواع الأجسام المضادة التى أمكن إنتاجها فى النباتات

التطبيق	النبات	الجسم المضاد	Signal sequence
Immunoglobulins:			
S. mutans SA I/II (dental cavities)	التبغ	sIg A (hybrid)	Murine IgG
S. mutans SA I/II (dental cavities)	التبغ	IgG (guy's 13)	Murine IgG
Surface antigen (colon cancer)	التبغ	IgG Co17-1A	Murine IgG/KDEL
Herpes simplex virus	فول الصويا	IgG (anti HSV-2)	Tobacco extensin
Single-chain Fv:			
Lymphoma	التبغ	scFv (38C13)	Rice α-amylase
Carcinoembryonic antigen (cancer)	الحبوب	scFv T84.66	Murine IgG/KDEL

جدول (١٩-٣) أمثلة لبعض اللقاحات التى أمكن إنتاجها فى النباتات.

المصدر	البروتين المُعَبَّر عنه	النبات	مستوى الإنتاج
لقاحات للإنسان			
Escherichia coli	Heat-labile enterotoxin B	التبغ	0.001% SLP
Vibrio cholerae	Cholera CtoxA and CtoxB subunits	البطاطس	0.3% TSP
Hepatitis B	Envelope surface protein	التبغ والبطاطس	<0.1% FW
Norwalk virus	Capsid protein	التبغ والبطاطس	0.23%/0.37% TSP
Rabies virus	Rabies virus glycoprotein	الطماطم	1% TSP
لقاحات للحيوان			
Foot and mouth virus	Virus epitope VP1	البرسيم الحجازى و *Arabidopsis*	N/A
Porcine coronavirus	Viral glycoprotein	التبغ والذرة	0.2% TSP/0.01% FW
Mink enteritis virus	Viral epitope VP2	الفاصوليا	N/A (CPMV)
Canine parvovirus	Peptide from VP2 capsid protein	*Arabidopsis*	3% SLP

إنتاج بروتين حليب المرضعات

أمكن تحويل البطاطس وراثيًا بالجين المسئول عن إنتاج بروتين اللبن الإنسانى (حليب المرضعات) β-casein، وبذا .. يمكن الحصول على بروتين هذا الحليب من مصادر نباتية يمكن استعمالها كبديل لأغذية الأطفال الصغار، بهدف تحسين قيمتها الغذائية (Chong وآخرون ١٩٩٧).

إنتاج الهرمونات

أمكن التعبير عن هرمون النمو الخاص بالسلمون المرقط *Oncorhynchus mykiss* فى بذور الـ *Arabidopsis* وأوراق التبغ (Bosch وآخرون ١٩٩٤).

إنتاج عقاقير أخرى متنوعة

قدَّم Malik (١٩٩٩) قائمة بالعقاقير واللقاحات التى أنتجت بطرق الهندسة الوراثية واعتمد استعمالها بدءًا بالأنسولين الإنسانى فى عام ١٩٨٢، ومرورًا بالأنواع المختلفة من الإنترفيرون interferon، والـ erythropoietin، والـ filgrastim وغيرها كثير

ونقدم فى جدول (١٩-٤) أمثلة لبعض المنتجات الصيدلانية التى أمكن إنتاجها فى النباتات من خلال عمليات التحول الوراثى

التحول الوراثى للأغراض الصناعية

يستفاد من الهندسة الوراثية فى تحويل النباتات إلى مفاعل بيولوجى لإنتاج الدهون والمواد الكربوهيدراتية والبروتينات للأغراض الصناعية ومن الواضح أن ذلك الهدف يتداخل مع هدف تحسين القيمة الغذائية، وهدف خدمة الأغراض الطبية، بل أن الهدف الأخير يمكن أن يندرج تحته

ونقدم فى جدول (١٩-٥) قائمة ببعض التطبيقات التى استخدمت فيها النباتات كمفاعلات بيولوجية لإنتاج مركبات متنوعة يمكن أن تستخدم – أو استخدمت بالفعل – فى الأغراض الصناعية

جدول (١٩-٤) أمثلة لبعض المنتجات الصيدلانية التي أمكن إنتاجها في النباتات عن طريق التحولات الوراثية (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

البروتين المُعَبَّر عنه	المصدر	النبات المحول وراثيًا	التطبيق
Protein C	الإنسان	التبغ	Anticoagulant
Hirudin	*Hirudo medicinalis*	لفت الزيت	Anticoagulant
Somatotrophin	الإنسان	التبغ	Growth hormone
β-Interferon	الإنسان	الأرز / اللفت / التبغ	Treatment for hepatitis B + C
Serum albumin	الإنسان	التبغ	Burns/fluid replacement, etc.
Haemoglobin -α and -β	الإنسان	التبغ	Blood substitute
Homotrimeric collagen	الإنسان	التبغ	Collagen
α_1-Antitrypsin	الإنسان	الأرز	Cystic fibrosis, haemorrhages
Aprotinin (trypsin inhibitor)	الإنسان	الذرة	Transplant surgery
Lactoferrin	الإنسان	البطاطس	Antimicrobial
ACE	الإنسان	التبغ / الطماطم	Hypertension
Enkephalin	الإنسان	*Arabidopsis* / لفت الزيت	Opiate
Trichosanthin -a	*Trichosanthes kirilowii*	التبغ	HIV therapy, cancer

ونلقي - فيما يلي - مزيدا من الضوء على بعض التطبيقات التي لاقت نجاحًا، أو نالت اهتمامًا خاصًا من الباحثين

إنتاج الإنزيمات

تستعمل الإنزيمات بكثرة في الصناعة لأغراض متنوعة، وهي تنتج لهذا الغرض من خلال عمليات التخمر الذي تستعمل فيه الخمائر وغيرها من الفطريات على نطاق واسع (جدول ١٩-٦) وتعد معظم تلك الإنزيمات ثابتة حراريًا حيث يناسب نشاطها - عادة حرارة تتراوح بين ٥٥، و ٩٠°م ونظرا لأن إنتاج تلك الإنزيمات يتحكم فيه جينات بسيطة؛ لذا اتجه الباحثون نحو محاولة نقل الجينات من البكتيريا إلى النباتات، مع جينات أخرى منظمة للتعبير عنها في أجزاء التخزين من النبات كالبذور أو الأوراق

جدول (١٩–٥): أمثلة على استخدام النباتات كمفاعلات بيولوجية لإنتاج الدهون، والمركبات الكربوهيدراتية، والبروتينات للأغراض الصناعية (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

المركب	مصدر الجينات	التطبيق	النباتات التي حولت وراثيًا
دهون:			
Medium chain fatty acids	California bay tree (*Umbellularia californica*) – Thioesterase	Food, detergent, industrial	لفت الزيت
Mono-unsaturated fatty acids	Rat-desaturase	Food	التبغ
Poly-hydroxybutyric acid	*Alcaligenes eutrophus*	Biodegradable plastics	*Arabidopsis*، لفت الزيت، وفول الصويا
Saturated fatty acids	*Brasica rapa*	Food, confectioneries	لفت الزيت
مواد كربوهيدراتية:			
Amylose free starch	*Solanum tuberosum* (GBSS)	Food, industrial	البطاطس
Cyclodextrins	*Klebsiella pneumoniae*-Cyclodextrin glucosyl transferase	Food, pharmaceutical	البطاطس
Fructans	*Bacillus subtilis* – Fructosyl transferase	Industrial, food	التبغ والبطاطس
Increased amount of starch	*E. coli* (glgC16)	Food, industrial	البطاطس
Trehalose	*E. coli*	Food, stabilizer	التبغ
بروتينات:			
Alpha-trichsantin	Chinese medicinal plant	Inhibition of HIV replication	*Nicotiana benthamiana*
Angiotensin converting enzyme inhibitor	Milk	Anti-hypersensitive effect	التبغ والطماطم
Antibodies	Mouse	Varioos	التبغ
Antigens	Bacteria, viruses	Orally administered vaccines	التبغ والطماطم، والبطاطس والخس
Antigens	Pathogens	Subunit vaccine	التبغ
Enkephalin	Human	Opiate activity	لفت الزيت، و *Arabidopsis*
Hirudin	Synthetic	Thrombin inhibitor	لفت الزيت

جدول (١٩-٦). استعمالات الإنزيمات فى الصناعات الغذائية (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

الإنزيم	الكائن المنتج له	الاستعمالات
Amylase & glucoamilase	قطر الـ *Aspergillus*	التحلل التام للنشا إلى جلوكوز
Glucose isomerase	البكتيريا والفطريات	تحويل الجلوكوز إلى فراكتوز يستخدم فى التحلية
Pectinase	الفطريات	تحليل المركبات المعقدة للجدر الخلوية يستعمل فى تسهيل ترشيح مستخلصات الثمار
Gluconase	الفطريات	تحليل المركبات المعقدة بالجدر الخلوية للحبوب. يستعمل فى جعل البيرة قابلة للترشيح
Lipoxygenase	البقوليات (البذور)	تبييض دقيق القمح.
Rennet extract	ينتج فى المعدة الرابعة للحيوانات المجترة .. يحتوى عدة إنزيمات أهمها الكيموزين chymosin	يجلط بروين اللبن، بما يجعل بالإمكان إنتاج مصل اللبن whey وخثارة اللبن curd.
Lactase	الخمائر والفطريات	يحول اللاكتوز (سكر اللبن) إلى جالاكتوز وجلوكوز يستعمل فى إنتاج بعض منتجات الألبان مثل Lactaid للأشخاص الذين يعانون من نقص اللاكتيز ولا يمكنهم تحمل اللاكتوز.
Proteases	البكتيريا والفطريات والنباتات	لها استعمالات كثيرة فى صناعة الجبن (كبديل لمستخلص المنفحة) ولجعل اللحوم أسهل مضغًا (meat tenderizers)
Lipases	تنتج فى المعدة الرابعة للحيوانات المجترة والكائنات الدقيقة	تحلل الدهون فى الجبن لإنتاج الأحماض الدهنية تستخدم فى إنضاج الجبن وتكوين مركبات تكسبها مذاقها الخاص.
Phytase	النباتات والكائنات الدقيقة	تحليل الـ phytate فى البذور لإطلاق الفوسفات. يمكن استخدامها فى معاملة عليقة الحيوانات لأجل توفير الفوسفات لها

وعلى الرغم من أن الإنزيمات التى تنتج بواسطة الكائنات الدقيقة فى عمليات التخمر تكون أكثر نقاوة عن تلك التى يمكن أن تنتجها النباتات المحولة وراثيًّا، والتى تحتاج إلى تنقيتها وفصلها عن البروتينات والمركبات الأخرى فى النبات قبل استعمالها فى الأغراض الصناعية .. على الرغم من ذلك فإن استعمال النباتات التى تحتوى على إنزيم معين قد يكون ذو فائدة تطبيقية كبيرة؛ فمثلاً إذا احتوت النباتات على إنزيم يلزم لتعديل العليقة المستعملة (بدلاً من إضافة ذلك الإنزيم إلى العليقة) فإن ذلك يعد أمرًا واعدًا وعلى سبيل المثال .. يساعد إنزيم الفيتيز phytase – الذى ينتج بالتخمر – والذى يضاف إلى العلائق الحيوانية – فى هضم حامض الفيتيك phytic acid، ولكن إنتاجه فى جزء نباتى مثل درنات البطاطس يجعل من الممكن إجراء عملية الهضم بسهولة بإضافة تلك الدرنات إلى العلائق الغنية بحامض الفيتيك (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

هذا ويُسمح فى المملكة المتحدة باستعمال خميرة محولة وراثيًّا فى صناعة الخبز. تحتوى تلك الخميرة على جين نقل إليها من سلالة قريبة منها، وهذا الجين يعمل على إسراع إنتاج إنزيمات معينة هى المسئولة عن التخمر. ونظرًا لأن الخميرة الجديدة قد حصلت على هذا الجين من سلالة قريبة مماثلة لها، فلم تكن هناك حاجة لتمييز هذا الخبز بأنه مصنع باستعمال خميرة محولة وراثيًّا (Connett & Barfoot ١٩٩٢)

ويستعمل الإنزيم الهاضم للبروتين subtilisin تجاريًّا مع منظفات الملابس، حيث يتعرض للكلورين، والمواد المؤكسدة، والحرارة العالية، والانحرافات الشديدة فى الـ pH. وقد تمكن العلماء من تحضير أكثر من ٨٠ طفرة من هذا الإنزيم، ولاحظوا أن استبدال المثيونين methionine فى الموقع ٢٢٢ بأى من الأحماض الأمينية المقاومة للأكسدة (الآلانين، أو السيرين، أو الثريونين) جعل الإنزيم أكثر ثباتًا، ولكن مع حدوث نقص فى نشاطه.

كذلك أمكن هندسة إنزيم آخر هاضم للبروتين وقادر على تحمل الكلورين أطلق عليه اسم Durazyme، وفيه استبدل المثيونين بأحماض أمينية أخرى. ولهذا الإنزيم القدرة على النشاط مع المنظفات الصناعية لإزالة البقع البروتينية (عن Malik ١٩٩٩).

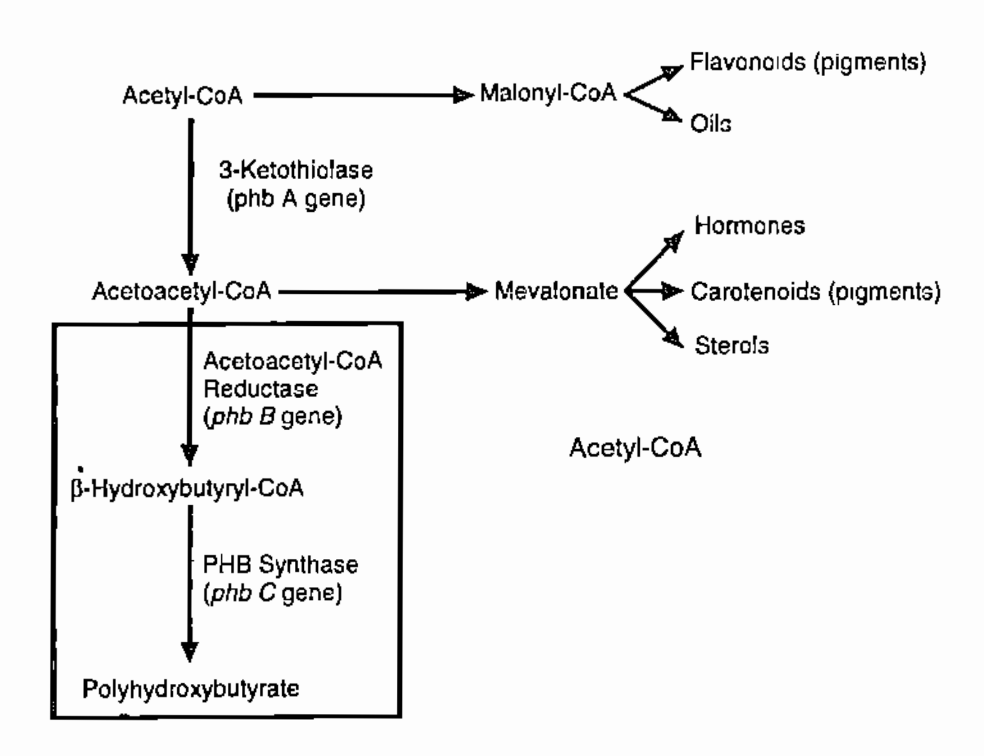
إنتاج بلاستيك يتحلل بيولوجياً

يتراكم المركب بولى هيدروكسى بيوتيريت polyhydroxybutyrate (اختصارًا: PHB) – وهو بوليستر polyester أليفاتى – بصورة طبيعية – كمادة مُخَزَّنة – فى عديد من الأنواع البكتيرية (مثل: *Alcaligenes euthophus*) بذات الكيفية التى يتراكم بها فى النباتات النشا، والزيوت، والسكروز، وغيرهم من المركبات المخزنة. ويستعمل – حاليًا – الـ PHB الذى تنتجه البكتيريا (وهو يماثل البلاستيك البترولى فى خصائصه) يستخدم بواسطة الصناعة كمصدر متجدد لتصنيع بلاستيك قابل للتحلل بيولوجيًا. هذا إلا أن المشكلة الرئيسية التى تواجه هذا التوجه هى صعوبة الحصول على كميات كبيرة من الـ PHB من خلال البكتيريا.

ولقد وجد أن تمثيل الـ PHB يلزمه ثلاثة إنزيمات فقط (شكل ١٩–١)، علمًا بأن الإنزيم الأول فى مسار تمثيل المركب يتواجد بالفعل طبيعيًا فى النباتات ولقد أمكن نقل الجينين الآخرين – بطرق الهندسة الوراثية – من البكتيريا إلى النبات *Arabidopsis thaliana*، وتبين أن الـ PHB يتراكم كحبيبات صغيرة فى السيتوبلازم، والنواة، والفجوات بخلايا النباتات المحولة وراثيًا. ولكن – ولسوء الحظ – كانت النباتات المحولة وراثيًا شديدة التقزم، ربما بسبب تحويل مسار أحد المركبات الوسطية الهامة (وهو Acetoacetyl-CoA) من الاتجاهات التى يحتاجها النمو النباتى إلى اتجاه تخزين الـ PHB وربما يمكن التغلب على مشكلة تقزم النمو بإدخال promoter ينظم تمثيل المركب فى البذور فقط بدلاً من تكوينه – كما حدث – فى جميع أجزاء النبات (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

وقد أمكن – بالفعل – حل مشكلة ضعف النمو النباتى وضعف إنتاج الـ PHA فى النباتات المحولة وراثيًا بإضافة تتابع نيكليوتيدى للجين يجعل الإنزيمات التى تكونها تستهدف التخزين فى البلاستيدات، مما وفر للإنزيمات تركيزات عالية من المادة الخام التى تعمل عليها لأجل تمثيل الـ PHB، ووفر حماية للخلايا النباتية الأخرى من أى احتمالات ضارة لتراكم الـ PHB بها. وقد أدى ذلك إلى زيادة تمثيل الـ PHB بمقدار

١٠٠ ضعف دون أن تحدث أى أضرار معنوية على النمو النباتى ومحصول البذور (عن Chawla ٢٠٠٠).



شكل (١٩-١): مسار تمثيل الـ **polyhydroxybutyrate** (اختصارًا: **PHB**) فى البكتريا والنباتات. تمثل الإنزيمات والجينات التى توجد داخل المستطيل تلك التى يلزم نقلها من البكتريا *Alcaligenes eutrophus* إلى النباتات؛ لجعلها قادرة على إنتاج الـ **PHB** (عن **Chrispeels & Sadava** ٢٠٠٣).



الفصل العشرون

تطبيقات الهندسة الوراثية بين الحقائق والأوهام والرفض والقبول

تعرضت الهندسة الوراثية – منذ نشأتها في بداية الربع الأخير من القرن الماضي وحتى الآن لهجوم شديد من قبَل بعض الأفراد والهيئات والمؤسسات، وحتى من قبَل بعض الحكومات، وفي المقابل .. فإنها لاقت – كذلك – قبولاً ودعمًا كبيرين من قِبل أفراد وهيئات ومؤسسات وحكومات أخرى وعلى الرغم من ارتفاع صوت جبهة الرافضين لهذا العلم الوليد، فإن جبهة الدعم عملت فيما يشبه الصمت، وتقدمت به تقدما حثيثًا إلى أن انتشرت المحاصيل والمنتجات الغذائية والصيدلانية المحولة وراثيًا، وتلك التي حولت وراثيًا لأغراض صناعية انتشرت انتشارًا هائلا في كثير من الدول؛ فهي موجودة بالفعل في عديد من العقاقير المتداولة (الأنسولين على سبيل المثال)، فضلاً عن الصعوبة الهائلة للتحكم في تواجدها ضمن مكونات المنتجات الغذائية المصنعة، التي قد يدخل المحصول الواحد المحول وراثيًا منها – كالذرة أو البطاطس أو فول الصويا – في تكوين العشرات – وربما المئات – من تلك المنتجات المصنعة.

وسوف نحاول في هذا الفصل عرض أسباب رفض الرافضين لهذا العلم وتخوفاتهم من تطبيقاته على كل من البيئة والإنسان، ومبررات دحض المؤيدين للعلم لتلك التخوفات، مع مناقشة موضوعية للأمور التي تنال قسطًا كبيرًا من اهتمام العاملين بهذا العلم تجنبًا لأي أخطار يمكن أن تحدث من جراء تطبيقاته، إلى جانب تعريف القارئ بالمدى الذي وصلت إليه التطبيقات العملية لعلم الهندسة الوراثية، وخاصة في المجال الزرعي

الاعتراضات على الهندسة الوراثية ومبررات رفض منتجاتها: أهى حقائق أم أوهام؟

تمهيد

يُثير الكثيرون اعتراضات عديدة على مبدأ الهندسة الوراثية بصفة عامة، وعلى نقل الجينات من الحيوان أو الإنسان إلى النبات – أو العكس – بصفة خاصة.

ويتساءل البعض: هل تناول الإنسان فى غذائه لجينات، أو للبروتينات التى تنتجها تلك الجينات – التى تكون قد نقلت إلى النباتات من الأبقار أو الخنازير – يعد أمرًا أخلاقيًّا؟ وهل يتنافى ذلك مع المعتقدات الدينية للهندوس (ممن يعبدون الأبقار) والمسلمين (الذين يحرم دينهم أكل الخنزير)؟ وهل إكثار تلك الجينات الحيوانية فى أحد الأنواع البكتيرية قبل إيلاجها فى النبات يغير من الأمر شيئًا؟، وهل إذا ما تم تخليق (تصنيع) جينات مطابقة للجينات الحيوانية المطلوب نقلها .. إذا ما تم تخليقها معمليًّا هل ذلك يغير من نظرة المعارضين أو يغير من الأمر شيئًا؟

وهل يمكن أن تتسبب البروتينات الجديدة التى تُمَثَّل بفعل الجين المنقول فى النباتات المحولة وراثيًا .. هل يمكن أن تتسبب فى إحداث أى نوع من الحساسية، وخاصة عندما يُعَبّر عن تلك الجينات فى حبوب اللقاح أو فى الأغذية التى يتناولها الإنسان ضمن طعامه.

وهل يمكن أن يؤدى التعبير عن الغلاف البروتينى لفيرس ما فى النباتات المحولة وراثيًا إلى أن يستعمله الحامض النووى لفيرس آخر كغلاف بروتينى له، مما قد يزيد من مدى عوائل الفيرس؟.

ومن بين الأسئلة الأخرى التى تحتاج إلى إجابة: هل يلزم تعريف المستهلكين بالمنتجات المحولة وراثيًّا ببيان ذلك – كتابة – على المنتج ذاته؟ .. وهل ذلك أمر ممكن فى ظل وجود مئات المنتجات الغذائية التى تدخل فى صناعتها محاصيل محولة وراثيًا مثل الذرة وفول الصويا؟ .. وهل إذا ثبت عدم وجود أى ضرر على صحة الإنسان من تناوله للمحصول المحول وراثيًّا يكون تعريف المستهلكين به أمرًا ضروريًّا ؟ وماذا عن حالات نقل الجينات الحيوانية للنباتات والتى قد تواجه باعتراضات دينية؟ أو حتى باعتراضات من النباتيين؟ (عن Dale & Irwin ١٩٩٥)

إن التعقيدات التى يمكن أن تصاحب فرص وضع بطاقات مميزة للمنتجات المحولة وراثيًا بالقانون يمكن أن تكون كثيرة جدًا؛ فالمنتج الواحد - كالذرة أو الطماطم - يمكن أن يدخل فى تصنيع العشرات من المنتجات المصنعة الأخرى .. ثم لماذا فرض هذا التمييز على المنتجات المحولة وراثيًا وهناك المئات من الأصناف التى تحتوى على جينات من أنواع نباتية أخرى وأنتجت بطرق تربية النباتات التقليدية؟. وبينما يعتقد البعض أن هذا حق لكل مستهلك، يعتقد آخرون أن هذا التمييز يكون ضرورة - فقط - عندما يكون قد حدث تغيير جوهرى فى القيمة الغذائية للمنتج، أو عندما يحتوى على بروتينات جديدة قد تسبب الحساسية (عن Grumet & Gifford ١٩٩٨).

ومن أهم المخاطر المحتملة التي ينادي بها المعترضون على الهندسة الوراثية، ما يلي:

١ - قد يتحول النبات المحول وراثيًا إلى حشيشة.

٢ - قد ينتقل الجين المنقول - إلى المحصول الزراعى - إلى الحشائش والنباتات القريبة منه تقسيميًا؛ الأمر الذى قد يزيد من حدة خطورتها كحشائش.

٣ - قد يؤدى تحرك الجين المعنى إلى الأنواع البرية إلى إحداث تعرية وراثية والقضاء على تباينات وراثية هامة.

٤ - قد تحفز النباتات المحولة وراثيًا لمقاومة الأمراض والآفات قد تحفز المسببات المرضية والآفات إلى إنتاج سلالات أكثر ضراوة.

٥ - قد تُحوِّر منتجات الجينات المعنية فى البيئة من خلال تأثيرها على الكائنات غير المستهدفة أصلاً.

٦ - قد تشكل منتجات الجينات المعنية أخطارًا بيولوجية على الإنسان والحيوانات والكائنات الأخرى.

٧ - قد تُشكِّل المركبات الوسطية - التى تقود إلى إنتاج المركبات المسئولة عنها الجينات المعنية - قد تشكل أخطارًا صحية، كما قد يحدث الأمر ذاته بالنسبة لنواتج تحلل تلك المركبات

ويرى المعارضون لاستخدام الأصناف المعدلة وراثيًا فى الزراعة أن أخطارها المحتملة

على الصحة العامة والحياة البرية كثيرة ومتنوعة، ولا تقتصر – فقط على استخدام تلك الأصناف في الغذاء مباشرة، وإنما تتعداه إلى احتمالات الأضرار الصحية التي يمكن أن تنجم عن استنشاق حبوب لقاحها، أو كنتيجة لدخولها ضمن مكونات أي غذاء مصنع.

كذلك يرى المعترضون أن انتشار الجينات المنقولة وراثيًا في الأنواع البرية القريبة أمر وارد ويمكن أن يؤثر على تنوعها البيولوجي وعلى قدرتها على البقاء والمنافسة في الظروف الطبيعية. وغني عن البيان أن تلك المخاطر – إن صحت – تزداد احتمالات حدوثها في مراكز النشوء والارتقاء ومراكز التباينات الوراثية – التي تكثر في الدول النامية – عما في المناطق الزراعية في الدول المتقدمة التي يقل فيها – كثيرًا – تواجد الأنواع البرية والحشائش المحصولية بالقرب من المحاصيل المزروعة (عن Bhat & Chopra ٢٠٠٠).

وقد ازداد الرفض لاستعمال النباتات المحولة وراثيًا من قبَل عديد من دول العالم، وذلك منذ عام ١٩٩٨، على الرغم من خضوع جميع الأصناف الجديدة المنتجة المحولة وراثيًا لاختبارات عديدة وموسعة وبإشراف حكومي، وهي التي أدت إلى اعتماد أصناف جديدة فيما لا يقل عن ٤٨ محصولاً زراعيًا.

ومن بين أهم مسببات الاعتراضات على النباتات المحولة وراثيًا التي اجتاحت العالم منذ عام ١٩٩٨، ما يلي:

١ – البرنامج التليفزيوني الذى أدعى فيه أحد الباحثين أن نباتات البطاطس المحولة وراثيًا التي يعبر فيها عن اللكتين lectin تؤدى إلى توقف نمو الفئران التي تتغذى عليها ولقد أدى هذا البرنامج التليفزيوني الذى أذيع في المملكة المتحدة إلى إشاعة الرعب من استعمال النباتات المحولة وراثيًا في المملكة المتحدة وغيرها من الدول الأوروبية. وعلى الرغم من أن تلك الدراسة قد أخضعت للتحليل من قبل الجمعية الملكية البريطانية، وتكرر التحليل بواسطة باحثين آخرين، وثبت خطأ الباحث (حيث لم يكن موفقًا لا في التصميم الإحصائي لتجاربه، ولا في تحليله لها) على الرغم من ذلك، فقد تركت أثرا سلبيًا كبيرا على تقبل المستهلكين لاستعمال النباتات المحولة وراثيًا.

٢ – أما المثال الثانى الذى أشاع الذعر من احتمالات التأثير السلبى للنباتات المحولة وراثيًا على الحياة البرية فقد جاء من الدراسات التى أجراها Losey وآخرون على الفراشة الملكة Monarch butterfly (وهى: *Danaus plexippus*)؛ ففى عام ١٩٩٩ نشر الباحثون أدلة على أن الجين Bt الموجود بحبوب اللقاح يضر بيرقات تلك الفراشة عامل الباحثون نباتات حشيشة اللبن milkweed – التى تتغذى عليها الحشرة – بحبوب لقاح نباتات ذرة محولة وراثيًا بجين الـ Bt. ولقد أظهرت هذه الدراسة المعملية أن ٥٠٪ من يرقات الحشرة ماتت فى خلال أربعة أيام. ولقد أدت هذه الدراسة – حينما نشرت إلى قيام المهتمين بشئون البيئة باحتجاجات ضد النباتات المهندسة وراثيًّا، وفى المقابل .. أوضح آخرون أن نتائج تلك الدراسة المعملية ليس لها وجود فى الظروف الطبيعية (عن Kempken ٢٠٠١).

هذا .. وتعد الدول الأوروبية واليابان من أكثر الدول معارضة لاستهلاك المحاصيل المعدلة وراثيًّا إلى درجة أن واردات الذرة لأوروبا – من الولايات المتحدة – انخفضت من ٣٠٥ مليون دولار أمريكى فى عام ١٩٩٦ إلى مليون دولار فقط فى عام ١٩٩٩. أما فى اليابان .. فإن أى شحنة من الذرة يُكتشف وجود أى نسبة من الحبوب المعدلة وراثيًّا فيها يتم مصادرتها وإعدامها فورًا (عن Ahlowwalia & Khush ٢٠٠١).

الانتشار غير المرغوب فيه لبعض جينات التحول الوراثى بطريق التلقيح الخلطى الطبيعى

يستعمل فى عمليات التحول الوراثى للنباتات جينات كثيرة من مصادر متنوعة، إلاّ أن التأثير البيئى لتلك الجينات لا يسهل التنبؤ به. وقد أطلق مصطلح "التلوث الوراثى" genetic pollution على ما يمكن أن يحدث من انتشار لجينات التحول الوراثى إلى أنواع نباتية أخرى لم تكن – أصلاً – مستهدفة لتلقى تلك الجينات.

ويقول المعترضون على الهندسة الوراثية أن انتقال الجينات من المحاصيل التي عُدِّلت بها وراثيًا إلى طرزها البرية أو إلى الأنواع البرية القريبة منها له مخاطره، كما يلي:

١ – إذا كان النوع المتلقي من الحشائش الهامة في منطقة ما، فإن انتقال الجينات التي استخدمت في عملية التعديل الوراثي إليها قد يزيدها خطورة، إذا قد تزداد قدرتها على المنافسة، أو قد تزداد قدرتها على الانتشار الجغرافي.

٢ – إذا كان للجين المنقول ميزة انتخابية عالية، فإنه قد يُثَبَّت في عشيرة الحشائش بسرعة كبيرة تنحسر معها التباينات الوراثية في الجينات التي ترتبط معها بتواجدها قريبًا من المنطقة الكروموسومية التي تلقت الجين المنقول. يحدث ذلك بسرعة كبيرة – خاصة – في الأنواع الذاتية التلقيح. وإذا ما كانت الحشيشة المتلقية هي – أصلاً – نادرة أو معرضة للانقراض، فإن هذا الفقد في التباين الوراثي قد يجعلها أقل قدرة – مستقبلاً – على التأقلم على التغيرات البيولوجية أو غير البيولوجية في البيئة المحيطة؛ مما قد يعرضها للانقراض من المواقع التي تتواجد فيها. وغني عن البيان أن الأمر ذاته قد يحدث بالنسبة لطرز الحشائش من المحاصيل الزراعية المحولة وراثيًا، وهي التي تُعد مخزون التنوع الوراثي بالنسبة لها (عن Bergelson وآخرين ١٩٩٩).

ومن أهم العوامل التي تؤثر في تسرب الجينات المستخدمة في عمليات التحول الوراثي وتمكنها من استمرار التواجد في البيئة الطبيعية، ما يلي:

١ – مدى القرب المكاني للأنواع البرية المتوافقة مع النوع المحول وراثيًا.

٢ – مدى تأقلم النباتات الهجين الناتجة على البيئة.

٣ – نظام التزاوج وطريقة التلقيح.

٤ – طريقة انتشار البذور.

٥ – الأهمية الانتخابية للصفة المهندسة وراثيًا (عن Hancock وآخرين ١٩٩٦).

هذا . وتتوفر أقارب برية لمعظم محاصيلنا الزراعية، وتعيش الأسلاف البرية – التي نشأت منها المحاصيل المنزرعة – غالبًا – مجاورة للحقول المزروعة. وغالبًا ما تحفز

الطرق الزراعية التقليدية المتبعة فى إنتاج المحاصيل الاقتصادية فى الدول النامية .. غالبًا ما تحفز العشائر الطبيعية على البقاء والاستمرار فى التكاثر فى بيئاتها الطبيعية. ويبين جدول (٢٠-١) الأقارب البرية المتوافقة مع عدد من المحاصيل التى حولت وراثيًّا - بالفعل - ومدى ذلك التوافق. يتبين من هذا الجدول مدى السهولة التى يمكن أن تنتشر بها الجينات المستخدمة فى عمليات التحول الوراثى إلى الأنواع البرية.

إن الجينات سوف تنتقل بسهولة من معظم المحاصيل المحولة وراثيًّا - إن لم تكن جميعها - إلى نباتات أخرى برية من نفس نوع المحصول أو إلى أنواع أخرى قريبة منه، ويتوقف الأمر على مكان إنتاجها. ويمكن القول أن لجميع المحاصيل الزراعية - تقريبًا - أقارب برية فى مكان ما من العالم. ولقد وجدت بالفعل أعداد كبيرة من الهجن التى تكونت طبيعيًّا بالتلقيح الخلطى بين تلك الأنواع البرية والأصناف العادية من المحاصيل الزراعية القريبة منها، خاصة وأن لمعظم المحاصيل الزراعية القدرة على نثر لقاحها على نطاق واسع ولمسافات بعيدة.

ونظرًا لأن انتقال تلك الجينات من النباتات المحولة وراثيًّا إلى النباتات الأخرى فى البيئة المحيطة بها يعد أمرًا حتميًّا، فإن المهم ليس هو "هروب" تلك الجينات فى حد ذاته، وإنما ماهية تلك الجينات. ولعل من أبرز الأمثلة على الانتقال - الذى حدث بالفعل - جين تحمل مبيد الحشائش جلوفوسينيت glufosinate من لفت الزيت *Brassica napus* إلى قريبه البرى *Brassica campestris*.

وإذا ما حُوِّل السورجم *Sorghum bicolor* وراثيًّا بأحد جينات المقاومة لمبيدات الحشائش (وهو أمر وراد على ضوء أهمية السورجم كمحصول حقلى، وإن لم يحدث بعد) إذا حدث هذا التحويل الوراثى فإنه سيكون من السهولة بمكان انتقال جينات المقاومة لمبيدات الحشائش إلى حشيشة الـ Johnsongrass (وهى: *Sorghum halepense*) الواسعة الانتشار، والتى تتلقح - طبيعيًّا - مع السورجم (عن Hancock وآخرين ١٩٩٦).

جدول (٢٠-١). الأنواع البرية المتوافقة مع بعض المحاصيل الزراعية التي حولت وراثيًا في الولايات المتحدة (عن Hancock وآخرين ١٩٩٦)

المحصول	الاسم العلمي	الأنواع البرية المتوافقة معه	أماكن تواجدها	مستوى التلقيح الخلطي (أ)	تواجد الهجن الطبيعية
البرسيم الحجازي	*Medicago sativa*	*M. sativa* برى	الشرق الأدنى/حوض البحر المتوسط	١	توجد
		M. glomerata	جنوب أوروبا/شمال أفريقيا	١	توجد
التفاح	*Malus domestica*	كثيرة	أمريكا الشمالية/أوروبا/الصين/آسيا	١	توجد
الشعير	*Hordeum vulgare*	*H. vulgare* برى	الشرق الأدنى	١	توجد
		H. spontaneum	الشرق الأدنى	١	توجد
البنجر	*Beta vulgaris*	*B. vulgaris* برى	أوروبا حتى الصين	١	توجد
الجزر	*Daucus carota*	*D. carota* برى	أوروبا/حوض البحر المتوسط/أمريكا الشمالية	١	توجد
القطن	*Gossypium hirsutum*	*G. hirsutum* برى	أمركيا الوسطى/البحر الكاريبى	١	لا توجد
		G. barbadense	أمريكا الجنوبية	٢	توجد
		أنواع أخرى عديدة	محليًا فى عدة مواقع	٢-٣	توجد
التوت البرى	*Vaccinium macrocarpon*	*V. microcarpon* برى	شرق أمريكا الشمالية	١	توجد
		V. oxycoccus	المناطق الشمالية	٣	لا توجد
الخيار	*Cucumis sativus*	*C. sativus* برى	آسيا	١	توجد
الباذنجان	*Solanum melongena*	*S. melongena* برى	الهند	١	توجد
		S. incanum	الهند/أفريقيا/آسيا	١	توجد
		أنواع أخرى عديدة	الهند غالبًا	٢-٣	لا توجد
الخس	*Lactuca sativa*	*L. serriola*	حوض البحر المتوسط	١	توجد
		L. virosa	حوض البحر المتوسط	١	توجد
		L. saligna	حوض البحر المتوسط	١	توجد

تابع جدول (٢٠-١).

المحصول	الاسم العلمى	الأنواع البرية المتوافقة معه	أماكن تواجدها	مستوى التلقيح الخلطى [أ]	تواجد الهجن الطبيعية
الذرة	*Zea mays*	الـ teosinate المحلية وهى *Z. mays*	المكسيك	٢-٣	متباينة
الكنتالوب	*Cucumis melo*	*C. melo* برى	أفريقيا	١	توجد
		C. metuliferus	أفريقيا	٢	لا توجد
		C. anguria	أفريقيا	٢	لا توجد
البسلة	*Pisum sativum*	*P. sativum* برى	الشرق الأدنى/حوض البحر المتوسط	١	توجد
		P. fulvum	حوض البحر المتوسط	٢	لا توجد
الفول السودانى	*Arachis hypogea*	*A. monticola*	أمريكا الجنوبية	١	لا توجد
		أنواع أخرى عديدة	أمريكا الجنوبية	٣	لا توجد
الفلفل	*Capsicum annuum*	*C. annuum* برى	أمريكا الجنوبية/المكسيك/جنوب الولايات المتحدة	١	توجد
		أنواع عديدة	أمريكا الجنوبية/المكسيك	١-٣	توجد
البرقوق	*Prunus domestica*	*P. spinosa*	أوروبا	١	توجد
		P. insititia	آسيا	١	توجد
		P. cerasifera	آسيا	١	توجد
		أنواع أخرى عديدة	أوروبا/آسيا/الصين/أمريكا الشمالية	١-٢	توجد
البطاطس	*Solonun tuberosum*	*S. tuberosum* برى	أمريكا الجنوبية	١	توجد
		أنواع أخرى عديدة	أمريكا الجنوبية	٢-٣	توجد

تابع جدول (٢٠-١).

المحصول	الاسم العلمى	الأنواع البرية المتوافقة معه	أماكن تواجدها	مستوى التلقيح الخلطى [أ]	تواجد الهجن الطبيعية
لفت الزيت	*Brassica napus*	*B. napus* برى	حوض البحر المتوسط	١	توجد
		B. campestris برى	حوض البحر المتوسط/أمريكا الشمالية	٢	توجد
		B. juncea	حوض البحر المتوسط	٢	توجد
		أنواع أخرى عديدة	حوض البحر المتوسط	٢-٣	متباينة
الأرز	*Oryiza sativa*	*O. sativa* برى	آسيا	١	توجد
		O. rufipogan	أفريقيا/الصين/أمريكا الجنوبية	١	توجد
		O. nivara	آسيا/الصين	١	توجد
		أنواع أخرى عديدة	آسيا/الصين/أفريقيا/أمريكا الوسطى	٢-٣	توجد
فول الصويا	*Glycine max*	*G. soya*	الصين	١	لا توجد (؟)
		G. gracilis	الصين	١	توجد (؟)
الكوسة	*Cucurbita pepo*	*C. texana*	جنوب شرق الولايات المتحدة/المكسيك	١	توجد
		C. fraterna	جنوب شرق الولايات المتحدة/المكسيك	١	توجد
الفراولة	*Fragaria × ananassa*	*F. virginiana*	أمريكا الشمالية	١	توجد
		F. chiloensis	شيلى/كاليفورنيا	١	توجد
قصب السكر	*Saccharum officinarum*	*S. spontaneum*	غينيا الجديدة/الهند/آسيا/أفريقيا	١	توجد
دوار الشمس	*Helianthus annuus*	*H. annuus* برى	غرب أمريكا الشمالية	١	توجد
		أنواع أخرى عديدة	غرب أمريكا الشمالية	١-٢	توجد
التبغ	*Nicotiana tabacum*	أنواع عديدة	الأمريكتين/أستراليا	١-٣	توجد

تابع جدول (٢٠-١).

المحصول	الاسم العلمى	الأنواع البرية المتوافقة معه	أماكن تواجدها	مستوى التلقيح الخلطى[أ]	تواجد الهجن الطبيعية
الطماطم	*Lycopersicon esculentum*	*L. esculentum* برى	أمريكا الجنوبية/المكسيك	١	توجد
		أنواع أخرى عديدة	أمريكا الجنوبية غالبًا	١-٣	متباينة
البطيخ	*Citrullus lanatus*	*C. lanatus* برى	أفريقيا	١	توجد
		C. colocynthis	شمال أفريقيا/غرب آسيا	١-٢	توجد
القمح	*Triticum aesativum*	*T. aesativum* برى	الشرق الأدنى	١	توجد
		عديد من الأنواع الثنائية والرباعية	الشرق الأدنى	٢-٣	توجد

أ - دلالات الأرقام: ١- التهجين سهل، و الهجن خصبة عمومًا، ٢ - عقد جزئى للثمار وخصوبة متباينة للجيل الأول الهجين، ٣ - التهجين محتمل ولكنه صعب، والهجن ضعيفة وذات خصوبة ضعيفة.

وقد اقترحت بعض التقنيات التى يمكن أن تُسهم فى منع انتقال الجينات من النباتات المحولة وراثيًا إلى غيرها من النباتات، ومن أهمها ما يلى:

١ - إجراء التحويلات الوراثية على البلاستيدات الخضراء.

تتميز هذه الطريقة بأن البلاستيدات تورث عن طريق الأم، وبذا يستحيل انتقال جينات التحول الوراثى عن طريق حبوب اللقاح، كما لا توجد أى خطورة على الإنسان أو البيئة من حبوب اللقاح التى تنتجها تلك النباتات، وهى التى تكون خالية من جينات التحول الوراثى، ولكن يُعاب عليها أن البروتينات المُعَبرَّ عنها قد لا تعمل بكفاءة، وإن كان من الممكن أن يكون التعبير عنها بدرجة عالية

٢ - إدخال صفة العقم الذكرى

تتميز هذه الطريقة باستحالة انتقال جينات التحول الوراثى عن طريق حبوب اللقاح، إذ إنها لا تتكون أصلاً أو تكون ضامرة

٣ - استخدام تقنية إنهاء حياة البذور.

نشرح هذه التقنية بالتفصيل فى موضع آخر من هذا الفصل، وهى تتميز بأن البذور التى تتكون بعد الجيل الذى زرعت بذوره المحولة وراثيًا تكون غير قادرة على الإنبات، إلا أن تلك التقنية لاقت اعتراضًا من قبل المهتمين بالجانب الإنسانى فى الزراعة

٤ - اللجوء إلى التكاثر اللاإخصابى apomixis.

تتميز تلك الطريقة بإمكان إكثار الهجن بواسطة المزارعين أنفسهم مع احتفاظها بقوة الهجين، ولكن يُعاب عليها أن صفة القدرة على التكاثر اللاإخصابى صفة معقدة، وليست شائعة كثيرًا (توجد فى حوالى ٤٠٠ نوع نباتى من ٤٠ عائلة)، فضلاً عن عدم وجود أى حافز لدى شركات البذور للاهتمام بها.

٥ - الاستفادة من ظاهرة اكتمال الإخصاب قبل تفتح الزهرة

تعرف هذه الظاهرة باسم cleistogamy، ولكن يعاب عليها أنها ليست كثيرة الشيوع فى المملكة النباتية، مع احتمال استمرار حدوث انتقال لحبوب اللقاح إلى النباتات الأخرى

٦ - الاستفادة من ظاهرة التخفيف أو التلطيف بالتحول الوراثى(transgenic mitigation).

بمقتضى هذه الظاهرة فإن تأثير جينات التحول الوراثى على المحصول المعدل وراثيًّا بها يكون متعادلاً أو مفيدًا له، بينما يكون تأثيرها ضارًّا على الحشائش. ولكن يعاب على تلك الطريقة أنها لا تمنع انتقال الجينات، وقد تتسبب فى اندثار طرز الحشائش القريبة من المحصول المزروع؛ مما يقلل من التنوع البيولوجى (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

٧ – ربما يمكن – مستقبلاً – التغلب على مشكلة انتقال الجينات – التى تحول بها المحاصيل الزراعية وراثيًّا – من المحاصيل المعدلة إلى الحشائش أو الأنواع البرية القريبة منها باستعمال constructs تُفقد حبوب اللقاح أو البويضات خصوبتها فى الأفراد التى تكون خليطة فى الجين المنقول؛ بما يعنى أن انتقال حبوب اللقاح من المحاصيل المحولة وراثيًّا إلى غيرها يؤدى إلى إنتاج هجن عقيمة. ويتطلب نجاح تلك الفكرة التأكد من أن الطفرات لن تُفقِد الـ constructs فاعليتها، وأنه لن يحدث عبور بين الـ construct والجين المنقول؛ الأمر الذى يترتب عليه – فى أى من الحالتين – إنتاج حبوب لقاح خصبة مع عدم تأثر خصوبة الهجن التى تتلقى الجينات المنقولة (عن Bergelson وآخرين ١٩٩٩).

وقد أوضحت الدراسات التى أجريت على نباتات البطاطس المحولة وراثيًّا (McPartlan & Dale ١٩٩٤) أن مدى انتقال الجينات – بالتلقيح الخلطى – من النباتات المحولة وراثيًّا إلى غير المحولة يتناقص بسرعة شديدة بزيادة المسافة بينهما إلى أن يصبح الانتقال معدومًا تقريبًا عند مسافة ١٠ أمتار، كما لم يكن هناك أى دليل على انتقال الجينات من البطاطس المحولة وراثيًّا إلى أى من *S. dulcamara* أو *S. nigrum* تحت ظروف الحقل.

وتوصل Love (١٩٩٤) من دراسته على الأخطار البيئية التى يمكن أن تشكلها زراعة البطاطس المحولة وراثيًّا – فى الولايات المتحدة وكندا – إلى أن انتقال الجينات المستخدمة فى عمليات التحول وانتشارها فى البيئة الطبيعية لا يشكل أى أهمية؛ ذلك لأن البطاطس ليست منافسًا للنباتات البرية فى خارج الحقول المزروعة، كما أنها لا

تتلقح طبيعيًا مع أنواع الجنس *Solanum* التى لا تكوِّن درنات، والتى تنتشر كحشائش فى مناطق إنتاج البطاطس. وعلى الرغم من تواجد ثلاثة أنواع مكونه للدرنات فى جنوب شرق الولايات المتحدة، هى: *S. fendleri*، و *S. jamesii*، و *S. pinnatisectum* فإن احتمال تلقح البطاطس معها يعد بعيدًا بسبب العزل الجغرافى، وعدم التوازن الإندوسبرمى، واختلاف مستويات التضاعف، وعدم التوافق

القول بأن النباتات المحولة وراثيًّا يمكن أن تصبح - ذاتها - حشائش

من بين الانتقادات التى وجهت إلى تحسين النباتات بطرق الهندسة الوراثية أن النباتات المنتجة ذاتها يمكن أن تصبح حشائش فهل هذا ممكن؟. إن العلماء يقدرون وجود نحو ١٣ صفة تتميز بها الأنواع النباتية التى تنمو كحشائش. وبينما تحتوى كل حشيشة على نحو ١١ أو ١٢ من تلك الصفات، فإن معظم المحاصيل الزراعية لا يوجد بأى منها أكثر من ٥ أو ٦ من الصفات الثلاث عشرة. والسؤال الذى يتبادر إلى الذهن هو. هل مجرد إضافة صفة جديدة - لا تمت بأية صلة إلى أى من تلك الصفات - يمكن أن تجعل المحصول الاقتصادى حشيشة؟ الإجابة المنطقية هى أن ذلك أمر بعيد الاحتمال إلاّ فى حالة واحدة، وهى حالة هندسة النباتات وراثيًا لجعلها أكثر قدرة على تحمل مبيدات الحشائش.

وبالنسبة للنباتات المحولة وراثيًّا لتحمل مبيدات الحشائش، فإن الانتقادات التى توجه لها تنحصر فى أمرين:

١ - أن يصبح المحصول المحول وراثيًا - ذاته -حشيشة

يمكن أن تصبح المحاصيل الزراعية حشائش إذا ما انتشرت بذورها قبل الحصاد وبقيت ساكنة فى التربة إلى حين زراعة المحصول التالى فى الدورة، حيث تنمو معه كحشيشة، وتحدث المشكلة الكبرى عندما يكون هذا النبات النامى كحشيشة مقاومًا لأحد مبيدات الحشائش المستعملة مع المحصول المزروع. وما من شك فى أن مشكلة ذلك

المحصول النامى كحشيشة تزداد تعقيدًا فيما لو كان مقاومًا لعدد من مبيدات الحشائش وليس لمبيد واحد، ولذا .. لا يوصى بتحويل المحاصيل الزراعية لمقاومة مبيدات الحشائش بنقل جينات المقاومة لعدة مبيدات - معًا - فى المحصول الواحد.

هذا .. إلا أن مشكلة المحصول الذى ينمو مع المحصول التالى له فى الدورة كحشيشة يمكن القضاء عليها بإكساب النباتات المحولة وراثيًّا جين إنهاء الحياة، وهو الجين الذى يفقد البذور الجديدة المتكونة على المحصول المحول وراثيًّا حيويتها، فلا يمكنها الإنبات، وهى تقنية لجأت إليها شركات إنتاج البذور لهدف آخر، وهو حماية منتجاتها من الإكثار غير المشروع.

٢ - أن ينتقل جين تحمل مبيدات الحشائش من المحصول إلى أصوله البرية التى نشأ منها، وبذا تصبح تلك الطرز البرية مقاومة - هى الأخرى - للمبيد. ولتجنب ذلك يوصى بإحاطة حقول المحاصيل المحولة وراثيًّا لمقاومة مبيدات الحشائش بحزام من النباتات العادية غير المحولة وراثيًّا (على اعتبار أن التلقيح الخلطى بين المحصول والحشائش يكون بين تلك التى توجد فى حواف الحقل والحشائش التى تنمو بريًّا فى المنطقة المجاورة للحقل (عن Gressel، و Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

المطالبة بالتخلص من الجينات المعلِّمة (مثل جينات المقاومة للمضادات الحيوية) من النباتات المحولة وراثياً

كانت جينات المقاومة لمضادات الحيوية التى تستعمل فى عمليات التحول الوراثى محل هجوم كبير من معارضى الهندسة الوراثية؛ حيث أثاروا احتمال انتقال تلك الجينات إلى الكائنات الدقيقة التى يرغب الإنسان فى مقاومتها بالمضادات الحيوية، وخاصة تلك التى قد تتواجد فى أمعاء الإنسان. وقد أوضح العلماء أنه على الرغم من انتقال الجينات من نوع بكتيرى لآخر، ومن أحد أنواع البكتيرية (الأجروباكتيريم) إلى النبات، فإن انتقالها من النبات إلى البكتيريا أمر لم يحدث أبدًا، ويستبعد حدوثه إلى شبه الاستحالة على الأقل إحصائيًّا. ففضلاً عن كون أن البكتيريا لها نظامها الخاص فى التعبير الجينى على المستوى الجزيئى للدنا الذى يختلف عما يوجد فى النباتات، فإن

تناول الإنسان للغذاء المعدل وراثيًّا، ومرور الدنا في جهازه الهضمى دونما هضم وتفتت، ثم انتقال جينات التحول الوراثى كاملة - بطريقة تتناسب مع نظام التعبير الجينى فى البكتيريا - إلى البكتيريا التى تعيش فى أمعاء الإنسان يعد أمرًا أبعد من حدود التصور (عن Chripeels & Sadava ٢٠٠٣).

ويمكن أن نضيف إلى ذلك أن جينات المقاومة لمضادات الحيوية التى تستعمل فى عمليات التحول الوراثى يحصل عليها أصلاً من البكتيريا، وأن المقاومة للمضادات الحيوية تتواجد بصورة طبيعية في البكتيريا، وغالبًا ما تُحمل على بلازميدات؛ مما ييسر انتقالها من سلالة بكتيرية لأخرى. ولذا .. يعد ظهور السلالات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية مشكلة حقيقة فى المستشفيات، التى تستعمل فيها المضادات الحيوية بصورة روتينية؛ مما يشكل وسيلة انتخابية تعمل فى صالح السلالات المقاومة. وعلى ضوء هذه الخلفية، فإن انتقال جينات المقاومة للمضادات الحيوية من النبتات إلى البكتيريا - حتى وإن حدث (وهو أمر يكاد يكون مستحيلاً) - لن يغير جوهريًا من وضع المقاومة للمضادات الحيوية فى البيئة.

كذلك فإن كثيرًا من جينات المقاومة الحيوية التى تستعمل - عادة - فى النباتات المحولة وراثيًّا (مثل npt II) تعطى مقاومة خاصة بمضادات حيوية لم تعد تستخدم فى معالجة الأمراض فى الإنسان؛ إذا إن استعمالها قد توقف منذ أن ظهرت بدائل أخرى أقل سمية للإنسان، أو أكثر فاعلية ضد البكتيريا التى تصيبه (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

وعلى الرغم مما تقدم بيانه . فقد تردد أن زيادة استهلاك النباتات المحولة وراثيًّا يتطلب التخلص من تلك الجينات المعلمة marker genes من المحصول المستعمل تجاريًّا؛ الأمر الذى تتطلبه بعض الدوائر الحكومية المسئولة عن تلك الأمور، مثل معهد روبرت كوخ الألمانى على سبيل المثال. ولقد دُرس على نطاق واسع موضوع مخاطر الجينات المعلمة على مستهلكي المحاصيل المحولة وراثيًّا، ووجد أنها كانت منخفضة بشدة ولقد تركزت تلك الدراسات أساسًا على معلمات مثل الـ neomycin

phosphotransferase، وهو جين معلم يستعمل حاليًّا، ويوجد – على سبيل المثال – في الطماطم المحولة وراثيًّا FlavrSavr وعلى الرغم من عدم توفر أي سبب علمي للحد من استعمال هذا الجين المعلم أو أي جين معلم آخر .. فإنه قد يكون من المرغوب فيه التخلص من تلك الجينات في النباتات المحولة وراثيًّا. هذا .. وتتوفر عدة طرق للتخلص من الجينات المعلمة تتباين في درجة كفاءتها (عن Kempken ٢٠٠١).

ومن بين الطرق المتبعة لأجل التخلص من الجينات الانتخابية المعلمة، ما يلي:

١ – عدم استعمال الجينات الانتخابية المعلمة في عملية التحول الوراثي من الأساس، والاستعانة باختبارات البيولوجيا الجزيئية – مثل الـ PCR – في تقييم وغربلة الأفراد (النباتات) الناتجة من عملية التحول الوراثي لتحديد تلك التي تلقت الجين المعني، إلاّ أن هذه الطريقة تعد مكلفة للغاية وتتطلب وقتًا وجهدًا كبيرين.

٢ – نقل الجين المرغوب فيه والجين الانتخابي المعلم على جزيئات T-DNA مستقلة، ثم – بعد تحليل الانعزالات التي تظهر في النسل – يمكن تحديد النباتات التي تحتوي على الجين المعني بالتحول الوراثي مع خلوها من الجين الانتخابي المعلم

٣ – استئصال الجين الانتخابي المعلم من النباتات المحولة وراثيًّا بعد إنتاجها، الأمر الذي يمكن تحقيقه بالاستعانة بإنزيمات recombinase خاصة بمواقع محددة site-specific. ومن أمثلة ذلك الإنزيمات التالية:

phage: P1 Cre-lox
Saccharomyces cerevisiae: FLP-frt
Zagosaccharomyces rouxii: R-RS

٤ – أمكن – حديثًا – الحصول على انعزالات في أنسال النباتات المحولة وراثيًّا لا تحتوي على الجينات الانتخابية المعلمة، وذلك بإحاطة تلك الجينات – في الـ vectors – بتتابعات ذات قدرة كبيرة على زيادة معدلات الانعزالات الكروموسومية.

ومن الآثار السلبية التي حدثت بالفعل من جراء تزايد تلك الاعتراضات على الهندسة الوراثية أنه في عام ١٩٩٦ حاولت شركة نوفارتس Novartis (سنجنتا Synjenta حاليًّا) تسجيل أحد أصناف الذرة المحولة وراثيًّا، والذي يحتوي على جين لمقاومة الأمبسلين. وقد لاقى ذلك الأمر اعتراضًا كبيرًا – ولمدة طويلة – من قبل الجهات المعنية بتسجيل

مثل هذه الأصناف فى المملكة المتحدة، ولكنه سُجِّل فى نهاية الأمر للزراعة فى فرنسا هذا إلاّ أن ما تردد فى وسائل الإعلام بشأن احتواء هذا الصنف على جين لمقاومة الأمبسلين جعل المستهلكين يحجمون عن استهلاكه، ومن ثم فإنه لم يزرع أبدًا على نطاق واسع (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

أخطار محتملة لجينات المقاومة – للفيروسات - الفيروسية المنشأ

إنتاج فيروسات أكثر ضراوة أو أكثر قدرة على الانتشار

إن الفيروسات التى يمكن أن تصيب النباتات المحولة وراثيًا لمقاومة فيرس ما قد يحدث فيها تغيرات فى التتابعات النيكليوتيدية بتبادل القواعد مع التتابعات المستخدمة فى عملية التحول الوراثى، مما يترتب عليه إنتاج فيروسات ذات صفات جديدة، مثل زيادة مدى العوائل، أو زيادة شدة الضراوة؛ فإذا ما انتشرت تلك الفيروسات الجديدة بعد ذلك، فإن أخطارها تكون كبيرة (عن Bergelson وآخرين ١٩٩٩).

تأثير جين الغلاف البروتيني الفيروسى على صحة الإنسان

فكر المهتمون بتأثير النباتات المحولة وراثيًا على صحة الإنسان فى اعتبار الغلاف البروتينى – فى النباتات المحولة وراثيًا لمقاومة الفيروسات – من المبيدات، نظرًا لأنه يحد من الإصابة الفيروسية، إلاّ أن مقارنة محتوى ثمار الكوسة العادية – مثلاً – غير المحولة وراثيًا والمصابة بالفيرس (موزايك الزوكينى الأصفر) لا يقل أبدًا عن محتوى النباتات المحولة وراثيًا من الفيرس، بل إنه قد يزيد فيها بمقدار ١٠٠ ضعف عما فى الثانية (عن Grumet & Gifford ١٩٩٨)

التخوف من أخطار محتملة للجين Bt

الأخطار المحتملة على صحة الإنسان

قصة ظهور وسقوط صنف الذرة استارلنك

كان استعمال الجين cry9C فى صنف الذرة المحول وراثيًا استارلنك StarLink مثار

اهتمام الكثيرين فى كل من أوروبا والولايات المتحدة. بدأت المشكلة عندما طلبت شركة AgrEvo (التى تغير اسمها - فيما بعد - إلى Aventis) الحصول على تصريح لتسجيل الصنف استارلنك فى الولايات المتحدة. ولقد أبدت وكالة حماية البيئة الأمريكية شكوكًا حول صلاحية البروتين Cry9C للاستهلاك الآدمى، لأنه أكثر ثباتًا فى الوسط الحامضى عن بروتينات الـ Cry الأخرى (ومن ثم فهو أبطأ هضمًا فى المعدة)، وكذلك لعدم وجود أى بيانات عما إذا كان مسببًا للحساسية أم غير مسبب ولقد قبلت الشركة تصريحًا محدودًا ومشروطًا للصنف لأجل البدء فى الدعاية له فى سوق تنافسية شديدة. وتبعًا لهذا التصريح المحدود فإن الصنف استارلنك لا يمكن استعماله إلاّ فى تغذية الحيوانات، ولا يدخل فى أى غذاء مخصص للاستهلاك الآدمى. وبدأت الشركة فى الزراعات التجارية للصنف، خاصة وأن الجزء الأكبر من إنتاج الذرة فى الولايات المتحدة يوجه إلى تغذية الحيوانات على أية حال، وذلك مع الاستمرار فى إجراء اختبارات الحساسية.

ولسوء الحظ .. ظهرت فى عام ٢٠٠٠ آثار من صنف استارلنك فى منتجات غذائية صنعت بواسطة Kraft Foods، وذلك قبل اعتماد استارلنك للاستهلاك الآدمى. ولقد أدى ذلك إلى سرعة سحب المنتج من الأسواق، والتحذير من استعمال الصنف فى أى منتجات غذائية أخرى، مما أدى إلى التوقف عن زراعته.

ولقد أظهرت تلك الحالة أهمية ثلاثة أمور:

١ - عدم إعطاء اعتمادات مشروطة للأصناف المعدلة وراثيًّا.

٢ - عدم تقديم الصنف للاعتماد قبل إخضاعه لاختبارات الحساسية.

٣ - اختبار مدى تواجد المحاصيل المحولة وراثيًّا فى المنتجات الغذائية التى يفترض خلوها منها (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الإثارة الإعلامية لمخاطر قيل أنها حدثت لفئران اعتمدت فى غذائها على بطاطس محولة وراثيًّا

إن القنبلة التى فجرها دكتور Pusztai فى برنامج تليفزيونى فى المملكة المتحدة عام

١٩٩٨ والتى ذكر فيها أن البطاطس المحولة وراثيًا سببت تغيرات (نموات غير طبيعية) فى أمعاء الفئران التى تغذت عليها – هذه القنبلة أدت خلال فترة قصيرة للغاية إلى سحب جميع الأغذية التى يدخل فى تكوينها منتجات محولة وراثيًا من أرفف السوبر ماركت فى المملكة المتحدة أذيع هذا البرنامج التليفزيونى قبل نشر البحث الذى توصل إلى تلك النتائج، وعلى أثره قام فريق من علماء الجمعية الملكية البريطانية بدراسة النتائج التى لم تكن قد نشرت بعد فى دورية علمية محكمة (نشرت تلك الدراسة – فيما بعد فى عام ١٩٩٩ – فى دورية The Lancet)، وذكرت فى تقريرها أن تلك الدراسة كانت معيوبة علميًّا فيما يتعلق بكل من تفاصيل الطريقة البحثية والاستنتاجات؛ فمن حيث الطريقة البحثية كانت هناك أخطاء فى التصميم الإحصائى، وطرق القياس، مع نقص فى تفاصيل النتائج. ومن حيث الاستنتاجات (التى جاء بهاء أن عملية التحول الوراثى للبطاطس – فى حد ذاتها – هى التى أعطت تلك التأثيرات) فإنها لم تكن صحيحة؛ إذ إن عملية التحول الوراثى لم تكن أبدًا – فى حد ذاتها – مسئولة عن أى تأثيرات، وإنما كان مرد التأثير إلى لكتين نبات زهرة اللبن الثلجية snowdrop lectin (الاسم العلمى للنبات *Galanth nivalis*) الذى يُحدث تضخمًا فى خلايا الجهاز الهضمى للفئران التى تتغذى عليه سواء أكان فى بطاطس محولة وراثيًّا، أم فى بطاطس أضيف إليها البروتين يدويًّا (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

وبتتبع إقبال المزارعين على استعمال البطاطس المحولة وراثيًا بهدف مقاومة حشرة خنفساء بطاطس كلورادو *Leptinotarsa decemlineata* – الأمر الذى يعد انعكاسًا لإقبال جمهور المستهلكين على تقبل تلك البطاطس – لوحظ أن نصيب البطاطس المحولة وراثيًّا من أسواق البطاطس فى الولايات المتحدة وكندا ارتفع من ١٪ فى عام ١٩٩٥ إلى ٢٪ فى ١٩٩٩، ثم انخفض إلى ٠٫١٪ فى عام ٢٠٠٠. وعلى الرغم من رغبة منتجى البطاطس فى زراعة الأصناف المحولة وراثيًا، فإن مقاومة المستهلكين لها حدَّ من إنتاجها، خاصة وأن سلاسل مطاعم الوجبات السريعة كانت سريعة الاستجابة لاعتراضات الجمعيات الداعية لمقاطعة المنتجات المهندسة وراثيًّا؛ الأمر الذى انعكس على كل سلسلة لتسويق والتصنيع (Guenthner ٢٠٠٢).

القول بوجود تأثيرات سلبية للجين Bt على الأعداء الطبيعية للحشرات

إن التوسع فى زراعة المحاصيل الزراعية المحولة وراثيًا بالجين Bt قد يكون له مردود سلبى على بعض الحشرات النافعة فى بيئة الزراعة، سواء أحدث ذلك من جراء تسرب Bt-toxin من جذور النباتات الحاملة للجين إلى التربة وبقاءه فيها لفترة طويلة، أو من جراء حرث بقايا النباتات المحولة وراثيًا – بكل ما تحمله من Bt-toxin – فى التربة (وذلك كما حدث بالنسبة للحشرة النافعة green lacewings التى تتغذى على حفار ساق الذرة الأوروبى)، وإما من خلال التغذية المباشرة للحشرة النافعة على النباتات الحاملة للجين Bt (كما حدث بالنسبة للـ Monarch caterpillars butterfly – وهى: *Danaus plexippus* – التى تعرض بقاءها للخطر عندما غُذيت بحبوب لقاح الذرة المحولة وراثيًا)، إلاّ أن الضرر الحادث فى أى من الحالتين يجب أن يقارن بالأضرار التى تحدثها المبيدات فى البيئة (عن Llewellyn & Higgins ٢٠٠٢).

وقد قام Birch وآخرون (١٩٩٩) باختبار تأثير تغذية الحشرة النافعة الـ 2-spot ladybird (وهى: *Adalia bipunctata*) على منّ الخوخ *Myzus persicae* الذى يتغذى على نباتات بطاطس محولة وراثيًا بالجين GNA، المتحصل عليه من نبات زهرة الثلج القطبية، والذى يتحكم فى إنتاج لِكتين lectin بروتينى مضاد للمنّ. بعد أن سُمح للحشرة النافعة بالتغذية على حشرة منّ الخوخ – المرباة على نباتات البطاطس المحولة وراثيًا – لمدة ١٢ يوم .. لوحظ تدهورًا فى خصوبتها، وفى حيوية بيضها، وفى فترة حياتها خلال فترة الأسبوعين إلى الثلاثة أسابيع التى أعقبت فترة التغذية. وعلى الرغم من عدم ظهور أعراض تسمم حادة على الحشرة النافعة، فإن فترة بقاء إناثها انخفضت بنسبة وصلت إلى ٥١٪. هذا .. وقد اختفت تلك التأثيرات الضارة لتغذية الحشرة النافعة على المنّ المربى على نباتات بطاطس محولة وراثيًا بالجين GNA .. اختفت بعد نقلها لتتغذى على حشرات من منّ البسلة سبقت تربيتها على نباتات فاصوليا غير محولة وراثيًا.

وفى المقابل .. وجد Riddick وآخرون (٢٠٠٠) من دراساتهم على البطاطس المحولة وراثيًا بالجين Cry3A من *Bacillus thuringensis* – بهدف مقاومة خنفساء بطاطس

كلورادو *Leptinotarsa decemlineata* – أن زراعة مساحات كبيرة منها تجاريًا – مع استعمال الحد الأدنى من المبيدات لمكافحة الآفات غير المستهدفة بالتحول الوراثى – لم تكن لها تأثيرات ضارة على عشائر الأعداء الطبيعية بمختلف أنواعها.

ادعاءات بتأثيرات سلبية للجين Bt على البيئة

أثار البحث الذى أجراه علماء جامعة كورنل ونشر عام ١٩٩٩ فى دورية Nature أثار جدلاً كبيرًا فى أوساط المهتمين بدراسات الهندسة الوراثية، حيث أعطى لناهضى الهندسة الوراثية سندًا قويًا لاعتراضاتهم على نشر زراعة الأصناف المحولة وراثيًا. قام العلماء فى تلك الدراسة بنثر حبوب لقاح من نباتات ذرة محولة وراثيًا بالجين Bt على أوراق حشيشة اللبن فى المختبر وتقديم ذلك كغذاء ليرقات فراشة الملكة monarch butterfly (وهى فراشة ضخمة ذات ألوان زاهية وتعد من أبرز الفراشات التى تستوطن أمريكا الشمالية)، علمًا بأن يرقات تلك الفراشة لا تتغذى فى الطبيعة إلا على أوراق حشيشة اللبن فقط، وهى الحشيشة التى تنمو بصورة طبيعية فى مختلف الحقول الزراعية، ومن ثم تصلها حبوب لقاح ذرة تحتوى على الـ Cry protein. أوضحت الدراسة أن اليرقات التى تغذت على أوراق حشيشة اللبن التى نثر عليها حبوب لقاح من ذرة تحتوى على الجين Bt لم تنمو جيدًا كتلك التى تغذت على أوراق الكنترول

ونظرًا لخطورة الأمر – على الأقل بالنسبة لمواطنى أمريكا الشمالية الذين يعشقون تلك الفراشة – فقد قامت ست فرق بحثية بمتابعة الموضوع ونشرت فى عام ٢٠٠١ ما توصلت إليه فى تقرير جماعى فى وقائع الجمعية الوطنية للعلوم بالولايات المتحدة Proceedings of the National Academy of Sciences USA وقد خلصت تلك الفرق البحثية فى تقريرها إلى أن البحث الذى نشر عن الآثار السلبية للـ Cry protein على فراشة الملكة لا يمكن اعتباره أكثر من تقرير أولى، حيث تعرضت طريقة دراسة الموضوع للنقد، وكان الاستنتاج النهائى للتقرير قلة الخطر على عشائر فراشة الملكة من أصناف الذرة الـ Bt المزروعة حاليًا (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

جوانب إيجابية للجين Bt غير مكافحة الحشرات

خفض الإصابة ببعض الأعفان

أوضحت دراسات Catch وآخرون (٢٠٠٢) أن تأثير الجين Bt – فى أصناف الذرة المحولة وراثيًا – على الإصابة بأعفان الساق كان متباينًا، حيث خَفَّض الإصابة بالمرض فى بعض السنوات، ولم يكن له ذات التأثير فى سنوات أخرى. وتجدر الإشارة إلى أن الإصابة بعفن الساق فى الذرة الذى يسببه عدد من الفطريات (منها: *Gibberella zeae*، و *Colletotrichum graminicola*، و *Fusarium verticilloides*) تحدث من خلال الجروح وحالة الشدّ الفسيولوجى التى تحدثها الإصابة بحفار ساق الذرة الأوروبى *Ostrinia nubilalis*.

وفى المقابل .. لم يجد Donegan وآخرون (١٩٩٦) أى تأثيرات للجين Bt فى البطاطس على أعداد العشائر الميكروبية، أو تنوع الأنواع الفطرية، أو مستويات الفطريات المرضة من أمثال *Pythium* spp.، و *Fusarium* spp.، و *Verticillium dahliae*، حيث تماثل التنوع البيولوجى الدقيق فى كل من حقول البطاطس المحولة وراثيًا بالجين Bt والحقول المعاملة بالمبيدات الحشرية الجهازية.

مزايا صحية محتملة للجين Bt

على خلاف ما أثير بشأن الأضرار الصحية والبيئية المحتملة للجين الـ Bt، فإن هناك من نادى بوجود مزايا صحية مؤكدة لهذا الجين فى بعض المحاصيل الغذائية، فقد أوضحت دراسات Schaafsma وآخرون (٢٠٠٢) أن نباتات الذرة المحولة وراثيًا بالجين Bt تقل فيها أخطار تواجد تركيزات عالية من الأفلاتوكسن: deoxynivalenol بالحبوب عند الحصاد، وخاصة فى المواسم التى تشتد فيها الإصابة بحفار ساق الذرة الأوروبى *Ostrinia nubilalis*، حيث تحدث الجروح بكثرة، وهى التى يمكن أن ينفذ منها الفطر *Fusarium graminearum* المسئول عن تكوين هذا الأفلاتوكسن وغيره. ولقد تبين من دراسات عديدة سابقة وجود علاقة قوية بين أعفان كيزان الذرة والإصابة بعدد من حشرات حرشفية الأجنحة.

وتعد هذه الدراسة امتدادًا لدراسات أخرى سابقة (عن Schaafsma وآخرين ٢٠٠٢) كان قد تبين منها أن مكافحة الحشرات القارضة بالمبيدات يقلل من الإصابة بأعفان الكيزان المسئولة عن تكوين عدد من الأفلاتوكسينات، والتى منها – إلى جانب الـ deoxynivalenol – الـ fumonisin، وأن حبوب هجن الذرة المقاومة لحفار ساق الذرة الأوروبى بالجين Bt أقل احتواء على الأفلاتوكسن الأخير

التخوف من أخطار محتملة لجينات المقاومة للأمراض الفطرية والبكتيرية

دُرسَ تأثير زراعة البطاطس المحولة وراثيًا بجين البكتيروفاج T4 lysozyme – الذى يكسبها صفة المقاومة للبكتيريا *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* دُرسَ تأثير زراعتها على كائنات التربة الدقيقة، بسبب إطلاقها للـ T4 lysozyme فى محيط الجذور، وهو الأمر الذى تحقق بالفعل – على الأقل – بالنسبة للبكتيريا *Bacillus subtilis* التى كانت متواجدة على الشعيرات الجذرية للنباتات المحولة وراثيًا والتى تأثرت سلبيًا، مقارنة بالحال فى النباتات التى لم تحول وراثيًا (Ahrenholtz وآخرون ٢٠٠٠).

التخوف من احتواء النباتات المحولة وراثياً على بروتينات يمكن أن تسبب الحساسية للإنسان

بينما يمكن أن تؤدى التحولات الوراثية إلى إنتاج نباتات تحتوى على بروتينات يمكن أن تسبب حساسية للإنسان (كما حدث عندما عدلت فول الصويا وراثيًا بجين بروتين الكاجو الغنى بالحامض الأمينى الضرورى مثيونين، والذى جعل فول الصويا من الأغذية المسببة للحساسية لدى بعض الأفراد الحساسين للكاجو، مما أدى إلى وقف هذا البرنامج حال اكتشاف تلك الحالات). بينما يمكن أن يحدث ذلك. فإن الهندسة الوراثية ذاتها يمكن أن تستخدم فى وقف نشاط الجينات المسئولة عن إنتاج البروتينات التى تسبب الحساسية فى بعض النباتات مثل الفول السودانى، والنقل مثل الجوز والكاجو (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

الاعتراض على تقنية إنهاء حياة البذور

لجأت بعض شركات البذور إلى توفير الحماية لأصنافها الجديدة بآلية تعتمد على الهندسة الوراثية، وذلك بالاستعانة بما يعرف باسم "تقنية الإنهاء" terminator technology، وهي تقنية تجعل من المستحيل على أى مزارع إكثار بذور الأصناف الجديدة بنفسه، حيث تكون جميع البذور التى ينتجها المزارع لديه غير قادرة على الإنبات، وهى التقنية التى أطلق عليها الدكتور أحمد مستجير اسم تقنية "البذور الشيطانية".

تعتمد هذه التقنية على خاصية اعتماد الجنين فى نموه وتطوره على جينات خاصة، مثله فى ذلك مثل أى جزء نباتى آخر، وبذا .. فإنه يمكن وقف نمو الجنين فى أى مرحلة من تطوره بالتحكم فى الجينات المسئولة عن تطوره. تقود تلك العملية – تلقائيًّا – إلى موت الجنين داخل البذرة دون التأثير على التكوين الطبيعى للبذرة أو على قيمتها الغذائية. ويعنى ذلك أن المزارع الذى يشترى التقاوى من شركات البذور يمكنه – مثلاً – إنتاج محصول جيد من الحبوب، لكنه لا يستطيع استعمال جزء من هذا المحصول فى زراعات تالية لأن أجنة البذور التى ينتجها تكون ميتة ولا يمكنها الإنبات.

ولأجل الاستمرار فى إنتاج بذور هذه الأصناف بمعرفة شركات البذور فإن على المربى أن يحتفظ بنباتات منها لا تحتوى على جين الإنهاء terminator gene، وهى التى تستخدم فى إنتاج بذور الهجن التى تستخدم فى الزراعة.

لقد طورت تقنية نظام الحماية technology protection بواسطة كل من وزارة الزراعة الأمريكية وشركة Delta & Pine Land Company، وهى تقنية أطلق عليها – كذلك – اسم الجين الناهى (أى واضع النهاية) terminator gene. وفى تلك التقنية تعدل الآباء وراثيًّا لكلى تحتوى على جين يقوم بقتل البذور بعد انتهاء تكوينها فى جيل الإنتاج المحصولى، بما يفيد فى حماية الشركات المنتجة للأصناف الجديدة من الإكثار غير القانونى لبذورها.

ويتطلب ذلك النظام توفر عدة مكونات، كما يلي:

١ – جين DNA recombinase، وهو خاص بإنزيم التعرف على قطعة معينة من الدنا، وفصلها، ثم إعادة لصق الأطراف المقطوعة.

٢ – بروتين مثبط يمكنه وقف نشاط إنزيم الـ recombinase.

٣ – جين promoter يسمح لجين مجاور لأن يعبر عن ذاته في مرحلة متأخرة من عملية تكوين البذرة.

٤ – قطعة من الدنا العائق blocking DNA التي يتعرف عليها جين الـ recombinase.

٥ – جين مسئول عن تمثيل مركب يؤدى – عند التعبير عنه – إلى قتل الخلية (lethal gene).

تولج قطعة الدنا العائق بين الجين الـ promoter والجين المميت lethal gene، مما يمنع الأخير من التعبير عن ذاته.

عند نقل تلك المكونات إلى نبات ما بطرق الهندسة الوراثية، فإن كلا من الـ recombinase والـ inhibitor يتم التعبير عنهما، بما يعنى أنه لا شئ يحدث، وتبقى البذور المنتجة حية. ولتفعيل النظام، تعامل البذور بمركب يمنع إنتاج البروتين المثبط، مما يؤدى إلى إطلاق الـ recombinase حرًا لكى يفصل الدنا المانع، ويوصل الـ promoter – مباشرة – بالجين المميت. ومع ذلك فلا شئ يحدث على التو لأن الـ promoter لا ينشط إلاّ فى المراحل المتأخرة من عملية تكوين البذور

يمكن للبذور المعاملة أن تنبت بصورة طبيعية وتنمو حتى اكتمال التكوين والنضج، لتكوِّن جيلاً جديدًا من البذور. وهنا فقط – بعد اكتمال تكوين البذور – يبدأ الـ promoter فى النشاط، ليعبر الجين المميت عن ذاته، مما يفقد تلك البذور حيويتها (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

وتفصيلاً لما أسلفنا إجماله، فإن تقنية إنهاء حياة البذور تعتمد على الجينات التالية:

١ – جين قاتل lethal gene (أو الـ terminator):

الجين القاتل هو أى جين يمكنه إنتاج بروتين سام للنباتات ولا يسمح للبذور

بالإنبات. يشفر الجين السام لبروتين مثبط للريبوسومات ribosome inhibiting protein (اختصارًا: RIP). يتعارض الجين الذى يشفر للـ RIP مع تمثيل كل البروتينات فى الخلية النباتية دون أن يكون ساما للكائنات الأخرى وعليه .. فإن التعبير عن جين الـ RIP فى خلايا الجنين يؤدى إلى منع إنبات البذور الحاملة له.

٢ - جين promoter:

يوصل الجين القاتل بجين منشط promoter خاص، ينشط فقط فى المراحل المتأخرة من تكوين البذرة، وهو - بذلك - يعد مثاليًا إذا ما رُغب فى التعبير عن الصفة فى الجيل الثانى لتلك البذور، فهو لا ينشط إلا بعد إكمال الجيل الأول لنموه الخضرى.

٣ - جين الـ Recombinase:

يشفر هذا الجين لتمثيل إنزيم يعرف باسم recombinase، وهو ينشط أثناء إنبات بذور الجيل الأول الحاملة لجين إنهاء الحياة لضمان إنباتها.

٤ - جين كابح repressible gene:

يُنتج هذا الجين ما يعرف بالبروتين الكابح repressor protein الذى يكبح منشط جين الـ recombinase، وهذا البروتين يفقد نشاطه عندما يرتبط مع التتراسيكلين.

بعد نضج البذور التى سوف يشتريها المزارعين - وهى التى تكون طبيعية تمامًا - تتم معاملتها بالتتراسيكلين قبل عرضها للبيع. وفى هذه البذور المعاملة يتوقف نشاط البروتين الكابح، وينشط جين الـ recombinase، الذى يعمل سريعًا على إزالة معوقات نشاط الجين الأول، الذى لا يظهر تأثيره إلا بعد استكمال تلك النباتات لنموها واقتراب بذورها من الوصول إلى مرحلة اكتمال النضج.

هذا .. ويمكن استخدام تلك التقنية - لحماية مصالح شركات البذور - فى كل من الهجن والأصناف الصادقة التربية على حد سواء. وفى حالة الهجن يمكن أن يحتوى أحد الأبوين على الجينين الأول والثالث، بينما يحتوى الأب الآخر على الجين الثانى (عن Chawla ٢٠٠٠)

تفنيد الاعتراضات على الهندسة الوراثية

على الرغم من الاعتراضات الكثيرة التى أثارها غير المتخصصين وكثير من الباحثين ضد المحاصيل المحولة وراثيًا واستعمالها فى غذاء الإنسان، فإن تلك الاعتراضات ليس لها – فى أغلب الأحيان – ما يبررها.

وقد قام Chrispeels & Sadava (٢٠٠٣) باستعراض تلك الاعتراضات وتفنيدها، كما يلى:

١ – إن القول أن النباتات المحولة وراثيًا تحتوى على دنا غريب عن الهيئة الكروموسومية للنوع النباتى المحول لا يحمل معه أية مخاطر على صحة الإنسان؛ فالإنسان يستعمل فى غذائه العادى أكثر من ١٠٠٠٠٠ جين تهضم جميعها لدى تناولها ضمن غذائه، ولا يوجد أى دليل على عدم قدرة الإنسان على هضم أى دنا جديد.

٢ – إن القول بأن البروتين الذى تنتجه النباتات المحولة وراثيًا – والذى يتحكم فى إنتاجه الجينات المنقولة إليه – قد يكون ضارا بصحة الإنسان أمر وارد ولكن هذا الأمر يجب أن ينظر إليه من عده وجوه، كما يلى.

أ – إن التطور الطبيعى لمحاصيلنا الزراعية حدث على مدى عشرات الآلاف من السنين انتقلت خلالها آلاف مؤلفة من الجينات بين مختلف الأنواع النباتية إلى أن تطورت محاصيلنا الزراعية كما نعرفها الآن.

ب – إن تربية وتحسين النباتات بالطرق الكلاسيكية تضمنت نقل مئات – وربما آلاف – الجينات من الأنواع البرية إلى المحاصيل الزراعية

جـ – إن تلك البروتينات الجديدة على المحصول المحول وراثيًا توجد بالفعل فى محاصيل أخرى زراعية يستعملها الإنسان فى غذائه، ولكنه يعرف كيف يتعامل معها، مثل الجين المسئول عن إنتاج البروتين المثبط: إنزيم الألفا أميليز الموجود فى بذور الفاصوليا – والذى يثبط تطور خنافس البذور بوقف نشاط إنزيم الألفا ُميليز بها – كما يُثبِّط – كذلك – الإنزيم ذاته فى الإنسان، ولكننا نعرف كيف نتعامل معه بطهى الفاصوليا جيدا قبل استهلاكها وهذا ما يجب فعله مع بذور أى محصول بقولى ينقل إليه هذا الجين

د - تخضع جميع الأصناف الجديدة المهندسة وراثيًا لاختبارات عديدة للتأكد من خلوها من أى من المركبات التى قد تسبب تسممًا للإنسان أو حساسية له، وتجرى تلك الاختبارات لكل حالة على حدة.

هـ - إن نقل جين واحد معلوم التأثير إلى أحد الأنواع التقليدية قد يكون أقل خطورة من نقل مثل هذا الجين بطرق التربية التقليدية، والتى تتضمن إجراء تلقيحات بين الأنواع المعنية تنتقل خلالها عديدًا من الجينات الأخرى - غير الجين المطلوب - والتى قد لا تعرف تأثيراتها.

٣ - الاعتبارات الأخلاقية:

يقول معارضوا الهندسة الوراثية أن مجرد نقل الجينات من كائنات حية مختلفة - نباتية كانت، أم حيوانية - يعد أمرًا غير أخلاقي، إلا أن تلك المقولة تتجاهل حقيقة أن الإنسان كان ولا يزال له تأثير كبير على تطور عديد من الأنواع بطرق التربية التقليدية.

٤ - المخاطر البيئية:

يقول المعارضون للهندسة الوراثية أنها تحمل فى طياتها مخاطر بيئية غير منظورة، ولكن تلك المخاطر ليست بأكثر من المخاطر غير المنظورة - والمخاطر التى حدثت بالفعل - من جراء نقل الكائنات الحية بين الدول والقارات، والتى أمكن التغلب عليها باستعمال الأعداء الحيوية لإعادة التوازن.

وبالنسبة لمشكلة الحشائش التى قد توجدها زراعة نباتات مهندسة وراثيًا فقد سبقت مناقشتها فى موضع آخر.

٥ - عدم الثقة فى المؤسسات الكبيرة المهتمة بالهندسة الوراثية:

تأتى عدم الثقة فى القول بأن تلك المؤسسات تبغى الربح على حساب صحة الإنسان ورفاهيته، ويضرب الناهضون للهندسة الوراثية المثل على ذلك بإنتاج الأصناف المتحملة لمبيدات حشائش معينة بهدف تحقيق الشركات لأرباح طائلة من وراء بيع بذور

الأصناف الجديدة والمبيدات معًا .. ومن ثم يزيد استهلاك المبيدات ويزداد تلوث البيئة، وتلك أمور واردة .. إلاّ أن المبيدات التي تحول النباتات وراثيًّا لأجل تحملها يتم اختيارها من بين أسرع المبيدات تحللاً وأقلها خطرًا على البيئة، كما أن المؤسسات ذاتها تنتج أصنافًا أخرى مقاومة للأمراض والحشرات، بهدف تجنب استعمال المبيدات الفطرية والبكتيرية والحشرية. ويمكن القول إجمالاً بأن المؤسسات الكبيرة المهتمة بالهندسة الوراثية ليست أكثر جشعًا عن المؤسسات الأخرى

٦ - اعتبارات التواصل sustainability considerations:

بالاعتماد على المحاصيل المحولة وراثيًّا - يقول المعارضون للهندسة الوراثية أن ذلك يبعدنا أكثر وأكثر عن الزراعة المتواصلة التي يقل فيها الاعتماد على المبيدات والعودة إلى الطبيعة، إلاّ أن تلك السياسات لا تتحدد بوساطة الهندسة الوراثية بقدر ما تحددها الحكومات والنظم المعمول بها (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

وعلى خلاف المعترضين على الهندسة الوراثية، فإن هناك من نادى بأنها تعمل على تأصيل مبدأ الزراعة المتكاملة، وهي الزراعة التي تكون قويمة بيئيًّا، وقابلة للتطبيق اقتصاديًّا، وعادلة اجتماعيًّا، وإنسانية تطبيقيًّا ولنأخذ مثالاً على ذلك محصول الطماطم وهو محصول يتطلب استثمارًا مكثفًا في إنتاجه، إلاّ أن الهندسة الوراثية تتيح لنا فرصة للعودة إلى الطبيعة في إنتاج ذلك المحصول، ذلك لأن استخدام الأصناف المحولة وراثيًّا لمقاومة الأمراض والحشرات سوف تقلل من الاعتماد على استعمال المبيدات في مكافحتها، وتلك التي حولت وراثيًّا لأجل تأخير فقد الثمار لصلابتها سوف تقلل من تكلفة النقل والتخزين، كما أن زراعة الأصناف المتحملة لمبيدات الحشائش يمكن أن يؤدي - وعلى خلاف الاعتقاد الشائع - إلى تقليل الاعتماد على مبيدات الحشائش (Hauptli وآخرون ١٩٩٠).

وتجنبًا للتكرار . فإننا لم نُعِد سرد الجهود التي بذلت، وأسفرت عن دحض العديد من الانتقادات التي وجهت للهندسة الوراثية كما جاءت فيما سبق بيانه في هذا الفصل.

لقد أدت المعارضة التى لقيتها الهندسة الوراثية إلى بطء تقدم انتشار زراعة الأصناف المعدلة وراثيًا فى مختلف دول العالم، وخاصة فى أوروبا. وحتى فى الولايات المتحدة الأمريكية التى لا تلقى فيها زراعة تلك الأصناف معارضة قوية، فإن الحملة ضد استهلاك الأغذية التى تدخل ضمن مكوناتها محاصيل معدلة وراثيًا حدٌ بصورة معنوية من صادرات الولايات المتحدة من تلك الأغذية؛ ومن ثم كان لذلك بعض التأثير السلبى على زراعتها فى داخل الولايات المتحدة أيضًا. ويعتقد الكثيرون أن وقف تدفق الصادرات الأمريكية الزراعية إلى الدول الأوروبية كان من أهم الأسباب الخفية وراء الحملة الأوروبية ضد المحاصيل المعدلة وراثيًا، خاصة وأن أوروبا - على الرغم من تقدمها التكنولوجى الهائل - مازالت تلهث وراء الولايات المتحدة فى معظم مجالات بحوث الهندسة الوراثية.

أما الدعم الذى تلقاه الجماعات المناهضة للهندسة الوراثية من جمعيات منتجى الزراعات العضوية فإن نتيجته الحتمية هو زيادة اتجاه المستهلك نحو المنتجات العضوية، وهو الذى يجد نفسه - مع التوسع فى زراعة الأصناف المعدلة وراثيًا على حساب الأصناف التقليدية - أمام أحد خيارين: إما استهلاك الغذاء المعدل وراثيًا، وإما استهلاك المنتجات العضوية، ومع استمرار حملات التشكيك فى مدى أمان الأغذية المحولة وراثيًا يزداد الإقبال على استهلاك المنتجات العضوية، ولاشك أن ذلك سبب رئيسى للدعم القوى الذى تلقاه الجماعات المناهضة للهندسة الوراثية من جمعيات منتجى الزراعات العضوية، خاصة وأن حملات التشكيك التى تقودها تلك الجماعات تبنى على أسلوب الإثارة التى تفتقد - فى أغلب الأحيان - إلى أى سند علمى أو واقعى.

والغريب فى الأمر أن الأرز الذهبى - الغنى بالكاروتين - والذى يعد مثالاً متكاملاً للتطبيقات المثلى للهندسة الوراثية - قد لاقى هو الآخر اعتراضات كثيرة من قِبَل الجماعات المناهضة للهندسة الوراثية، مثل Greenpeace.

وقد لخص المسئول الأول عن إنتاج هــذا الأرز - الباحــث Ingo Potrykus - مزاياه فيما يلى:

١ - يستفيد منه بصفة أساسية الفقراء وغير القادرين.

٢ - يعطى لصغار المزارعين مجانًا ودونما أية قيود على زراعته

٣ - يمكن إعادة زراعته سنويًا بالاعتماد على البذور المتبقية من الموسم السابق

٤ - لا يشكل أى مزايا خاصة لكبار المزارعين الأغنياء على حساب صغار المزارعين.

٥ - لم يُنتج عن طريق شركات التكنولوجيا الحيوية أو لأجلها، ولا تستفيد تلك الشركات منه ماديًا

٦ - يُعد علاجًا مجانيًا دائمًا لنقص فيتامين أ، ولا يحتاج إلى أى موارد أخرى لأجل استخلاص الفيتامين منه، أو تصنيعه، أو توزيعه.

٧ - يتجنب كل الآثار الجانبية السلبية التى واكبت الثورة الخضراء.

٨ - يمكن زراعته دونما حاجة لأية موارد إضافية.

٩ - لا يقلل من التنوع البيولوجى الزراعى.

١٠ - لا يؤثر فى التنوع البيولوجى الطبيعى.

١١ - لا توجد له أى تأثيرات بيئية سلبية يمكن تخيلها.

١٢ - لا توجد له أى أخطار صحية على المستهلكين يمكن التفكير فيها.

١٣ - كان من المستحيل تطويره بطرق التربية التقليدية.

وعلى الرغم من كل ما تقدم بيانه من مزايا للأرز الذهبى، فقد تم الاعتراض عليه بقوة كما أسلفنا. وقد قيل فى تبرير ذلك أنه لا يوفر سوى ٢٠٪ من حاجة الإنسان اليومية من فيتامين أ، بينما سيؤدى الاعتماد عليه إلى ضعف الاهتمام بالأغذية الأخرى الغنية بهذا الفيتامين، وهو اعتراض لا يمكن الدفاع عنه إذا إنه يُسلِّم - ابتداءً - بأن مجرد الاستهلاك الآدمى العادى من هذا الأرز يوفر له ٢٠٪ من احتياجاته اليومية من فيتامين أ.

ويبدو أن السبب الرئيسى لاعتراض المعترضون على الأرز الذهبى هو أنه سيكون بمثابة حصان طروادة للمحاصيل الأخرى المعدلة وراثيًا، بمعنى أنه إذا ما كان هذا الأرز

المعدل وراثيًّا مقبولاً، فإن ذلك سيفتح البـاب أمـام زراعـة المحاصـيل الأخـرى المحولـة وراثيًّا (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الاختبارات التى تجرى على الأصناف المحولة وراثيًّا قبل إطلاق زراعتها

إن إنتاج صنف جديد محول وراثيًّا لا ينتهى بمجرد عزل الجين المرغوب فيه وإيجاد وسيلة لإيلاجه فى جينوم المحصول المطلوب تحويله وراثيًّـا، ذلـك لأنـه مـا أن يتحقـق ذلك إلاّ ويلزم مرور الصنف الجديد بكل الأمور المتعلقـة باختبـارات تسـجيله، كمـا هـى الحال مع أى صنف آخر ينتج بطرق التربية التقليدية، كما يتعين قبول هذا الصنف مـن جانب المزارعين ومُصَنِّعى المحصول، ثم يتعين بعد ذلك خضوع الصنف الجديد لعمليات الإكثار التى تكفى للتوسع فى زراعته على نطاق تجارى.

وتصمم الاختبارات الحقلية التى تجرى على النباتات المحولـة وراثيًّـا لكـى تجيب على عديد من الأسئلة، منها ما يلى:

١ – هل يكون للجين المنقول أى تأثير على كائنات أخرى؟.

٢ – فى حالة نقل الجينات المتحكمة فى إنتاج البروتينات السـامة للحشرات .. هـل يكون لها أى تأثير على أنواع حشرية ليست معنية بهـذا التحـول (كالحشـرات النافعـة مثلاً). وهل يـكون لها أى متبقيات تتخلف فى التربـة بعـد حصـاد المحصـول المحـول وراثيًّا؟ وإذا كان الأمر كذلك .. فهل يكون لها أى تأثير على الكائنات الدقيقة بالتربة.

٣ – هل يؤثر الجين المنقول على بقاء النبات فى البيئة الزراعية أو على زيادة قدرتـه على المنافسـة إلى درجـة إمكـان غـزوة للبيئـة الطبيعيـة علـى حسـاب الأنـواع الأخـرى المتواجدة طبيعيًّا؟ بمعنى آخر هل يمكن أن تصبح النباتات المحولة وراثيًّا حشيشـة غـير مرغوب فيها؟.

٤ – ما هى احتمالات انتقال الجين من النبات المحول وراثيًّا إلى العشائر الطبيعيـة، وما هى النتائج التى يمكن أن تترتب على ذلك؟ .. أى هل يمكن أن تنتقل جينات مثـل المقاومة للحشرات وتحمل مبيدات الحشائش إلى الأنواع الأخـرى القريبـة (سـواء أكانـت

مزروعة أم برية) بالتلقيح الخلطي؟، علمًا بأن ذلك أمر ممكن، ولكن ما هي احتمالات بقاء تلك الأنسال التي تنتج من التلقيح الخلطي بين النباتات المحولة وراثيًا والأنواع القريبة منها وراثيًا ومكانيًا؟ إن الإجابة على ذلك تعتمد على مدى خصوبة تلك الأنسال (الهجن)، ومدى توفر الظروف التي تجعل التكاثر والانتخاب لتلك النباتات أكثر من غيرها، كتواجد الحشرات أو مبيدات الحشائش التي تقاومها، أو الظروف البيئية القاسية التي تتحملها أكثر من قدرة العشائر الطبيعية على تحملها (عن Dale & Irwin ١٩٩٥).

ويتباين كثيرًا الجهد المبذول في الاختبارات الحقلية الموسعة باختلاف المحصول، حيث يتوقف على أمرين رئيسيين، هما: مدى سهولة إجراء عمليات التحول الوراثي في المحصول، ومدى أهميته من الوجهة الزراعية. وعلى سبيل المثال .. تُعد الطماطم والبطاطس من أسهل المحاصيل في عمليات التحول الوراثي، بينما تعد الذرة وفول الصويا من أصعبها، إلاّ أن الأهمية الاقتصادية العالية جدًا للذرة تجعله يتقدم اهتمامات المشتغلين بالهندسة الوراثية.

وفي حصر للاختبارات الحقلية التي أجريت في الولايات المتحدة على مختلف المحاصيل المحولة وراثيًا خلال الفترة من ١٩٨٧ إلى ٢٠٠١، تبيّن ما يلي (عن Grumet ٢٠٠٢).

المحصول	عدد الاختبارات	المحصول	عدد الاختبارات
الذرة	٣٢٥٣	البطاطس	٦٩٥
فول الصويا	٥٧١	الطماطم	٥٠٤
القطن	٤٩١	القمح	٢١٢
التبغ	١٨٩	لفت الزيت	١٦٢
القاوون	١٣٠	بنجر السكر	١٢٦
الأرز	١٢٥	البرسيم الحجازي	١٠٢
الـ bentgrass	٩٧	الخس	٦٩
الكوسة	٦٠	الحور	٥٦
الفراولة	٤٠	العنب	٣٢
قصب السكر	٣١	دوار الشمس	٣٠

المحصول	عدد الاختبارات	المحصول	عدد الاختبارات
التفاح	٢٨	الشعير	٢٨
الخيار	٢٤	البسلة	٢٢
الفول السودانى	٢٠	*Brassica oleracea*	١٨
حشيشة كنتكى الزرقاء	١٨	الصنوبر	١٥
Sweet gum	١٤	الجزر	١٣
البيتونيا	١٣	الباباظ	١٣
الجوز	١٢	البطيخ	٩
الراسبرى	٩	البطاطا	٨
الباذنجان	٧	*Festuca arundinacea*	٧
bella dona	٦	الجريب فروت	٥
الكمثرى	٥	الغُرنوقى (البلارجونيم)	٥
حشيشة برمودا	٥	البصل	٤
البرسيمون	٤	الرودندرون	٣
البرقوق	٣	البن	٣
الأقحوان	٢	الجلاديولس	٢
الراى	٢	حشيشة سانت أوجستين	٢
الأناناس	١	البيسية spruce	١
النعناع	١	الخولان	١
الكاسافا	١	الشيكوريا	١
الكرانبرى	١		

ولعل من أبرز مساوئ إنتاج الأصناف بطرق الهندسة الوراثية ضرورة خضوع تلك الأصناف لمئات التجارب وآلاف التحاليل التى تجرى لإثبات عدم اختلافها فى قيمتها الغذائية والطبية عن الأصناف المتداولة من نفس النوع المحصولى، وعدم وجود أى أضرار لها على الإنسان أو الحيوان أو البيئة. ومن الواضح أن هذا الكم الهائل من الدراسات لا يمكن أن تقوم به سوى الشركات الكبيرة؛ مما يترك الشركات الصغيرة ومؤسسات البحث الجامعية والحكومية غير قادرة – ماديًا – على الإسهام بجهدها العلمى فى إنتاج أصناف جديدة معدلة وراثيًا.

الانتشار الواسع لتطبيقات الهندسة الوراثية على أرض الواقع

لن أعيد هنا شرح المزايا التي تُجنى من تطبيقات الهندسة الوراثية في مجالات التحسين الوراثي للنباتات، وتحقيق الأمن الغذائي للبشرية، فتلك أمور تناولناها بالتفصيل في عديد من فصول سابقة من هذا الكتاب، وسنكتفي في هذا المقام بمجرد إعادة التذكرة بهذا الموضوع، لكي يمكن الإحاطة بكل جوانبه، أما اهتمامنا الرئيسي الآن فإنه ينصبُّ على مدى الانتشار الذى حققته تطبيقات الهندسة الوراثية على أرض الواقع في كافة المجالات، ففى ذلك إجابة على الأسئلة المستترة التي جاءت ضمن عنوان هذا الفصل هل التقدم في تطبيقات الهندسة الوراثية حقيقة أم خيال؟ وهل هي مقبولة على أرض الواقع أم مرفوضة ؟

استعراض لأبرز إنجازات الهندسة الوراثية فى شتى المجالات

حصر موجز بالتقدمات

حققت الهندسة الوراثية تقدمًا ملموسًا في المجالات التالية:

١ – تحسين المقاومة للأمراض والآفات وتسهيل مكافحة الحشائش:

- تحمل مبيدات الحشائش.
- مقاومة الفيروسات.
- مقاومة البكتيريا.
- مقاومة الفطريات
- مقاومة الحشائش.

٢ – تحمل الظروف البيئية القاسية:

- تقليل الحساسية للبرودة.
- تحمل الشد الرطوبي.
- تحمل الملوحة.

٣ – تحسين الجودة والنوعية بعد الحصاد:

- تأخير فقد الثمار لصلابتها.

• تأخير شيخوخة أزهار القطف.

• زيادة محتوى ثمار الطماطم من المواد الصلبة.

• زيادة محتوى درنات البطاطس من النشا.

• زيادة نسبة السكر بالخضروات.

٤ – تحسين إجراءات تربية النبات:

العقم الذكرى وإنتاج بذور الهجن.

٥ – تحسين القيمة الغذائية:

• زيادة محتوى البذور من الحامضين الأميتيين الضروريين مثيونين methionine وليسين lysine.

• إنتاج نباتات مراعى غنية فى الأحماض الأمينية الكبريتية.

٦ – الزراعة الجزيئية molecular farming بهدف إنتاج:

• الزيوت.

• النشا.

• البلاستيك.

• الإنزيمات.

• المركبات الدوائية.

٧ – إصلاح الأراضى الملوثة بالسموم detoxifying contaminated soils (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

تحسين الدخل والحالة الغذائية فى الدول النامية

إن من أبرز إنجازات الهندسة الوراثية فى مجال تحسين الدخل والحالة الغذائية فى الدول النامية، ما يلى:

١ – إنتاج بطاطا مقاومة لفيرس تبرقش البطاطا الريشى sweet potato feathery mottle virus، علمًا بأن البطاطا تعد المحصول الخامس فى الأهمية – من حيث الإنتاج – على مستوى العالم (بعد كل من القمح، والأرز، والذرة، والكاساقا)، وأن الفيرس

المنى هو من أخطر فيروسات البطاطا فى المناطق الاستوائية. وقد تحققت المقاومة للفيرس بنقل جين الغلاف البروتيني للفيرس إلى البطاطا (عن Zeigler ٢٠٠١).

٢ – إنتاج الأرز الذهبى الغنى فى الكاروتين:

سبق لنا تناول هذا الموضوع بالشرح تحت عنوان آخر فى هذا الفصل، وما يعنينا هنا هو التأكيد على الأهمية الغذائية للأرز بالنسبة لبلايين البشر، وكيف أن هذا الأمر – وحده – يمكن أن يُسهم بصورة جوهرية فى تحسين المستوى الغذائى لمستهلكى الأرز.

لقد أنتج الأرز الذهبى فى مؤسسات أهلية لا تتبع أى من الشركات، وبدعم مالى عام لكى يمكن تزويد المزارعين به بحرية، دونما تحكم من الشركات التى تقوم – عادة – بإنتاج مثل تلك الأصناف. ولقد وجد بعد استكمال إنتاج السلالات المعدلة وراثيًا أن تطويره تضمن اللجوء إلى طرق وتقنيات تحميها ٧٠ من حقوق الملكية الفكرية intellectual propery rights، وحقوق حماية التقنيات technology protection rights؛ الأمر الذى حتَّم مفاوضة أصحاب تلك الحقوق للتنازل عنها فيما يتعلق باستخدامها فى إنتاج الأرز الذهبى، وهو ما تحقق بالفعل لأسباب متباينة، منها: إيمان بعض شركات التكنولوجيا الحيوية بالهدف النبيل من وراء فكرة زراعة الأرز الذهبى كغذاء غنى بالكاروتين لبلايين البشر، واعتقاد أكثريتها أن ذلك الأمر سوف يكون له – فيما لو تحقق – تأثيرات إيجابية يمكن أن تخفف من حدة المعارضة للهندسة الوراثية، بينما أدركت بعض الشركات الأخرى أن الوقوف ضد هدف إنتاج الأرز الذهبى سيزيد من نقمة شعوب العالم عليها.

ونظرًا لأن إنتاج سلالات الأرز الذهبى تم فى معامل سويسرية بعيدًا عن مناطق زراعة الأرز التقليدية فى آسيا وأفريقيا؛ لذا .. كان لزامًا تطوير تلك السلالات بكل الطرق الممكنة – بما فى ذلك طرق التربية التقليدية – لكى تتوائم مع الظروف البيئية وطرق الإنتاج ورغبات المستهلكين فى مناطق الإنتاج؛ وهو الهدف الذى يجرى العمل من أجل تحقيقه على قدم وساق، وذلك من خلال المجلس التى تم تشكيله لهذا الغرض، وهو: المجلس الخيِّر للأرز الذهبى Golden Rice Hunanitarian Board (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

المكافحة الحيوية

إن من بين التطبيقات الهامة للهندسة الوراثية زيادة كفاءة الكائنات الدقيقة المستخدمة في المكافحة الحيوية للبكتيريا والفطريات المرضة للنباتات.

إن المكافحة الحيوية للأمراض النباتية تقوم على الأسس التالية:

١ – المقاومة المستحثة induced resistance، والحماية المكتسبة cross protection.

٢ – خفض شدة ضراوة سلالات الكائن المرض hypovirulence

٣ – زيادة شدة التنافس بين الكائنات المستخدمة في المكافحة الحيوية والكائنات المرضة competition.

٤ – إنتاج مضادات الحيوية (كما يحدث بواسطة بعض أنواع الأكتينوميسيتات والبكتيريا والفطريات) antibiosis.

٥ – التطفل mycoparasitism.

ولقد أمكن الاستفادة من تقنيات الهندسة الوراثية في جميع تلك الأمور، وفي كل من الأمراض التي تصيب النباتات عن طريق النموات الهوائية، وتلك التي تحدث فيها الإصابة عن طريق النمو الجذري.

كما أمكن الاستفادة من الهندسة الوراثية – كذلك – في زيادة كفاءة الميكوريزا (عن Estrella & Chet ١٩٩٨).

إنتاج العقاقير الطبية واللقاحات

لقد نجح استخدام التكنولوجيا الحيوية في إنتاج الأدوية نجاحًا باهرًا، وذلك بالاعتماد على كائنات مثل *Escherichia coli*، والخمائر، حيث تستعمل حاليًّا في إنتاج الأنسولين البشرى erythropoeitin ومركبات أخرى كثيرة بكميات ضخمة. وتلى ذلك اتجاه الدراسات نحو ما أصبح يعرف باسم biopharming، الذى يُعنى به استعمال تكنولوجيا الهندسة الوراثية في إنتاج بروتينات آدمية من النباتات أو الحيوانات الزراعية بعد تحويلها وراثيًّا، حيث تصبح تلك النباتات والحيوانات مصانع لإنتاج البروتينات البشرية. وحاليًّا ينتج ألبيومين سيرم الدم البشرى، والـ factor III (وهو

عامل ضرورى فى استجابة الجسم لإصلاح الأضرار التى تحدث فى الأوعية الدموية) بنتج هذان المركبان فى لبن الماعز المحولة وراثيًا. وهناك مركبات أخرى آدمية كثيرة أمكن إنتاجها فى الحيوانات والنباتات الزراعية (عن Meiri & Altman ١٩٩٨).

ولقد قطعت الهندسة الوراثية شوطًا بعيدًا فى إنتاج العقاقير الطبية والفكسينات (اللقاحات)، وهو أمر – على عكس الحال فى المحاصيل الزراعية المهندسة وراثيًا - لاقى قبولاً كبيرًا من العامة على مختلف توجهاتهم. ويذكر Persley (١٩٩٧) أنه فى عام ١٩٩٥ - بعد سنوات قليلة فقط من تطبيق الهندسة الوراثية عمليًا – كان هناك ٣٤ منتج صيدلانى مهندس وراثيًا ومعتمد من إدارة الغذاء والدواء الأمريكية إلى جانب ٢٨٤ من المنتجات المحتملة الأخرى التى كانت تحت التجارب الطبية فى الولايات المتحدة، كان ٤٠٪ منها لأجل علاج السرطان، ونحو ١٠٪ لعلاج الأيدز AIDS/HIV وتجدر الإشارة إلى أن هذه الأعداد من المنتجات الصيدلانية المهندسة وراثيًا فى ازدياد متسارع إلى درجة حدت ببعض الباحثين إلى التنبؤ بأن المنتجات الصيدلانية المهندسة وراثيًا سوف تشكل – مع بدايات القرن الحادى والعشرين – الغالبية العظمى من المنتجات الصيدلانية الجديدة وينعكس هذا الاتجاه – بدوره – على الميزانيات التى يخصصها القطاع الخاص فى الدول الغربية لأبحاث إنتاج الأدوية المهندسة وراثيًا، والتى بلغت فى الولايات المتحدة وحدها ٨ بلايين دولارًا فى عام ١٩٩٥، بينما بلغت ميزانية بحوث الهندسة الوراثية فى المجال الزراعى بليون دولار أمريكى – فقط – فى العام ذاته

تحويل النباتات إلى مفاعلات بيولوجية

أمكن من خلال تقنيات الهندسة الوراثية استعمال المحاصيل الزراعية فى إنتاج مركبات ذات أهمية تجارية كانت – فيما مضى – لا تنتج إلاّ بواسطة نباتات برية، أو بواسطة حيوانات أو كائنات دقيقة، أو لا تنتج تجاريًا وبذلك أمكن استعمال المحاصيل الزراعية المحولة وراثيًا كمفاعلات بيولوجية bioreactors لأجل الإنتاج الاقتصادى للمركبات الكيميائية والدوائية، وهو ما أصبح يعرف باسم الزراعة الجزيئية molecular farming.

ولقد أمكن الحصول على مجموعة كبيرة من المركبات الكيميائية من النباتات بعد تحويلها وراثيًا بجينات غريبة عنها، وحى مركبات لا تقتصر على البروتينات، وإنما تمتد لتشمل مركبات محورة من خلال التعبير الجينى لإنزيمات معينة. إن النمو النباتى ليس أمرًا مكلفًا، ويمكن للخلية النباتية بالنباتات الراقية توفير منتجات خاصة لا يتيسر إنتاجها عن طريق الكائنات الدقيقة، وتكون المنتجات المستخلصة منها خالية من التلوث البكتيرى. وبذا .. يمكن استعمال بذور النباتات المحولة وراثيًا كمخزن رخيص – يستعمل عند الحاجة – للمركبات المعنية، بزراعتها للحصول على المركبات المرغوب فيها.

ومن بين أهم المركبات التى أمكن إنتاجها فى نباتات حولت وراثيًا، ما يلى:

١ – البيبتيدات النشطة حيويًا bioactive peptides.

٢ – البروتين الإنسانى، مثل الـ human serum albumin (فى البطاطس)، والإنترفيرون الإنسانى human interferons الذى يفيد فى دفاع الجسم ضد الفيروسات (فى اللفت والتبغ).

٣ – الإنزيمات، مثل الألفا أميليز (فى التبغ المحول وراثيًا)، والفيتيز phytase (فى التبغ).

٤ – اللقاحات vaccines، مثل لقاح الالتهاب الكبدى الوبائى B (فى التبغ).

٥ – المنتجات الصناعية، مثل الـ cyclodextrins (فى البطاطس)، والبولى استر الذى يتحلل بيولوجيًا poly-D-(-)-3-hydroxybutyrate (فى *Arabidopsis thaliana*).

٦ – الأجسام المضادة antibodies، مثل الـ immunoglobulins، علمًا بأن الأجسام المضادة التى تنتج فى النباتات المحولة وراثيًا لا يمكن تمييزها عن تلك التى تنتج فى الحيوانات (عن Pueyo & Hiatt ١٩٩٨).

استعراض لنوعيات الجينات التى استخدمت فى عمليات التحول الوراثى فى شتى المحاصيل

نقدم فى جداول (٢٠–٢) إلى (٢٠–٤) استعراضًا لنوعيات الجينات التى استخدمت فى عمليات التحول الوراثى فى شتى الأنواع النباتية مرتبة، كما يلى:

- جدول (٢٠-٢) يقدم قائمة بالجينات مصنفة حسب الهدف من إجراء عملية التحول الوراثى، مع بيان مصادر الجينات المستعملة والبروتينات التى تتحكم فى إنتاجها.

- جدول (٢٠-٣) يقدم قائمة بالجينات كما فى جدول (٢٠-٢)، مضافًا إليها نوعيات الصفات التى تتحكم فيها تلك الجينات.

- جدول (٢٠-٤) يعد مكملاً للجدولين (٢٠-٢)، و (٢٠-٣).

جدول (٢٠-٢): أمثلة لجينات نقلت بطرق الهندسة الوراثية لمحاصيل زراعية متنوعة (عن Dale وآخرين ١٩٩٣، و Dale & Irwin ١٩٩٥).

الصفة النباتية المعدلة وراثيًا	ناتج الجين المستعمل فى التحول الوراثى	مصدر الجين	أمثلة لمحاصيل حولت وراثيًا
المقاومة للحشرات:			
آفات حشرية متنوعة	بروتين Bt القاتل للحشرات	*Bacillus thuringiensis*	القطن – الطماطم – الذرة
آفات حشرية متنوعة	بروتين مثبط للتربسين trypsin	اللوبيا	التبغ
المقاومة للفيروسات:			
فيرس تبقع الباباظ الحلقى	جين الغلاف البروتينى	فيرس تبقع الباباظ الحلقى	الباباظ
فيرس موزايك الخيار	جين الغلاف البروتينى	فيرس موزايك الخيار	الخيار
فيرس موزايك الطماطم	جين الغلاف البروتينى	فيرس موزايك الطماطم	الطماطم
فيرس التفاف أوراق البطاطس	جين الغلاف البروتينى	فيرس التفاف أوراق البطاطس	البطاطس
فيرس إكس البطاطس	جين الغلاف البروتينى	فيرس إكس البطاطس	البطاطس
فيرس واى البطاطس	جين الغلاف البروتينى	فيرس واى البطاطس	البطاطس
المقاومة للفطريات:			
Alternaria longipes	إنزيم الشيتينيز chitinase	*Serratia marcescens*	التبغ
Rhizoctonia solani	إنزيم endochitinase	الفاصوليا	التبغ
Rhizoctonia solani	بروتين مثبط للريبوسوم	الشعير	التبغ
تحمل الشد البيئى:			
تحمل الكادميم	بروتين رابط للـ metallothionein	الفئران	التبغ
تحمل الصقيع	بروتين مضاد للتجمد	نوع السمك *Pseudopleuronectes amcricans*	الطماطم – التبغ
تحمل البرودة	الإنزيم glycerol-3-phosphate acyltransferase	*Arabidopsis thaliana*	التبغ

تابع جدول (٢٠-٢):

الصفة النباتية المعدلة وراثيًا	ناتج الجين المستعمل فى التحول الوراثى	مصدر الجين	أمثلة لمحاصيل حولت وراثيًا
تحمل مبيدات الحشائش:			
الجلايفوسيت	نظير للإنزيم EPSP synthase	عدة جينات نباتية وميكروبية	فول الصويا – القطن – الكتان
السلفونيل يوريا sulfonylurea	الإنزيم acetolactate synthase	*A. thaliana*	الذرة – لفت الزيت – الكتان
الجلوفوسينيت glufosinate	الإنزيم phosphinothricin acetyltransferase	*Streptomyces hygroscopicus*	لفت الزيت – الكرنب – الطماطم – البرسيم الحجازى – البطاطس – القمح
بروموكسينيل bromoxynil	Bromoxinil-specific nitrilase	*Klebsiella ozaenae*	القطن
الـ ٢، ٤–د 2,4-dichloro phenoxyactic acid	2,4-D mono-oxygenase	*Alcaligenes eutrophus*	القطن – التبغ
صفات الجودة فى الأغذية:			
زيادة القدرة على التخزين	Antisense polygalacturonase	الطماطم	الطماطم
زيادة حامض الاستياريك Stearic	Antisense stearoyl- ACP desaturase	*Brassica rapa*	لفت الزيت
زيادة المانيتول mannitol	Mannitol dehydrogenasen	*Escherichia coli*	التبغ
زيادة المثيونين methionine	بروتين يخزن فى البذور	*Bertholletia excelsa*	فول الصويا – لفت الزيت
تحسين نوعية البروتين	Chicken ovalbumin	الدجاج	البرسيم الحجازى
زيادة محتوى النشا	ADP-glucose pyrophosphorylase	*E. coli*	البطاطس
مُحَسِن للطعم	Synthesized monellin	ممثل صناعيًا	الطماطم
زيادة حامض اللوريك lauric	Lauroyl-ACP	*Umbellularia californica*	لفت الزيت

تابع جدول (٢٠-٢):

الصفة النباتية المعدلة وراثيًا	ناتج الجين المستعمل فى التحول الوراثى	مصدر الجين	أمثلة لحاصيل حولت وراثيًا
إنتاج مركبات كيميائية خاصة:			
serum albumin	السيرم الإنسانى	الإنسان	البطاطس
Enkephalins	Leu-enkephalin	جين كيميرى يتكون جزء منه من الإنسان وجزء آخر من *Arabidiopsis thalina*	لفت الزيت
Cyclodextrin	Cyclodextrin glycosyltransferase	*Klebsiella pneumoniae*	البطاطس
بلاستيك يتحلل بيولوجيًا	Polyhydroxybutyrate	*Alcaligenes eutrophus*	*Arabidopsis*
نظم التربية:			
العقم الذكرى	Ribonuclease and ribonuclease inhibitor	*Bacillus amyloliquefaciens*	لفت الزيت
انتشار حبوب اللقاح	إنزيم acetolacetate synthase	*Arabidopsis thaliana*	البطاطس
	إنزيم Phosphinothricin acetyltransferase	*Streptomyces hygroscopicus*	لفت الزيت
لون الأزهار:	Dihydroflavonol 4-reductase	الذرة	البيتونيا
الدارسات الوراثية:			
التعبير الجينى	Chloramphenicol acetyl transferase	*Escherichia coli*	التبغ – لفت الزيت
	Neomycin phasphotransferase	*E. coli*	البطاطس – لفت الزيت
التنظيم الجينى	ADP glucose pyrophosphorylase	*E. coli*	البطاطس – الطماطم
	Sucrose phosphate synthase	الذرة	الطماطم

جدول (٢٠-٣) أمثلة متنوعة لبعض الجينات التى استخدمت فى عمليات التحول الوراثى لبعض المحاصيل الزراعية الهامة (عن Owens ١٩٩٥).

الجين المنقول	الصفة التى يتحكم فيها	المحصول المحول وراثيًا
تحسين النوعية أو المحصول:		
Antisense polygalacturonase	بطء فقد الثمار لصلابتها	الطماطم
Antisense ACC synthase	تأخر نضج الثمار	الطماطم
Antisense ACC oxidase	تأخر نضج الثمار	الطماطم
Antisense stearoyl-ACP desaturase	محتوى عالٍ من حامض الاستياريك stearic (18:0) acid	بذور لفت الزيت
Omega-3 desaturase	محتوى عال من حامض اللينولينك Linolenic (18:3) acid	*Arabidopis*
Monellin	بروتين حلو	الطماطم
Maize sucrose-P synthase	محصول عالٍ من الثمار	الطماطم
Escherichia coli ADP *glucose pyrophosphorylase*	محتوى عالٍ من النشا والوزن الجاف	البطاطس
Ribonuclease	العقم الذكرى	التبغ – لفت الزيت
Dihydroflavonol reductase	لون الأزهار	البيتونيا Petunia
منتجات خاصة.		
Acetoacety-CoA reductase and PHB synthase	إنتاج البلاستيك (polyhyroxybutyrate)	*Arabidopsis*
Cyclodextrin glucosyl transferase	إنتاج الـ cyclodextrin	البطاطس
Human serum albumin	إنتاج الـ serum albumin	البطاطس
Enkephalin pentapeptide	إنتاج الـ Leu-enkephalin endorphin	لفت الزيت
Lauroyl-ACP thioesterase	محتوى عالٍ من حامض اللوريك Lauric (12:0) acid	لفت الزيت
تحمل الظروف البيئية القاسية:		
Mannitol-1-P dehydrogenase	تحمل الملوحة	التبغ
Glycerol-3-P acetytransferase	تحمل البرودة	التبغ
Fish antifreeze protein	تحمل التجمد	التبغ – الطماطم
Superoxide dismutase	تحمل التجمد ومبيد حشائش والأوزون	البرسيم الحجازى – التبغ
تحمل مبيدات الحشائش:		
2,4-D monooxygenase	تحمل المبيد 2,4-D	التبغ

تابع جدول (٢٠-٣):

الجين المنقول	الصفة التى يتحكم فيها	المحصول المحول وراثيًا
Bromoxynil-specific nitrilase	تحمل الـ bromoxynil	التبغ
Phosphinothricin acetyl transferase	تحمل الـ gluphosinate	البطاطس – الطماطم
Mutated EPSP synthase	تحمل الـ glyphosate	التبغ
Mutated acetolactate synthase	تحمل الـ sulfonylurea	التبغ
القاومة لمسببات الأمراض والآفات:		
Specific virus coat protein	القاومة للفيروسات ذات العلاقة	العديد
Viral replicase	القاومة للفيروسات ذات العلاقة	التبغ
Viral-specific antisense	القاومة للفيروسات ذات العلاقة	العديد
Pokeweed ribosome-inhibiting protein	المقاومة لعديد من الفيروسات	التبغ – البطاطس
Bacillus thuringensis (Bt) insecticidal protein	مقاومة يرقات حرشفية الأجنحة	التبغ – الطماطم
Cowpea trypsin inhibitor protein	المقاومة لعديد من الحشرات	التبغ
Isopentenyl transferase (ipt)	المقاومة لعديد من الحشرات	*Nicotiana plumbaginifolia*
Barley ribosome-inhibiting protein	القاومة للفطر *Rhizoctonia solani*	التبغ
Bean chitinase	القاومة للفطر *R. solani*	التبغ – لفت الزيت
Bacterial chitinase	القاومة للفطر *Alternaria longipes*	التبغ
Tobacco osmatin	القاومة للفطر *Phytophthora infestans*	البطاطس
Bacteriophage lyzozyme	القاومة للبكتيريا *Erwinia carotovoral* subsp. *atroseptica*	البطاطس
Tomato Pto (a protein kinase)	المقاومة للبكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	الطماطم
Barley α-thionin	القاومة للبكتيريا *P. syringae* pv. *syringae*	التبغ
Insect cecropin	القاومة للبكتيريا *E. carotovora*، و *P. solanaceorum*	البطاطس – التبغ

جدول (٢٠-٤): أهم الجينات ونواتج الجينات التى استخدمت فى عمليات التحول الوراثى فى المحاصيل الاقتصادية الهامة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

الصفة الزراعية	الجين المنقول أو ناتج الجين
المقاومة للحشرات	Bt, CpTi, PIN I, PIN II, αAI, GNA, Mi-I
المقاومة لمبيدات الحشائش	bxn, bar, tfda, aroA, ALS
المقاومة للفيروسات	جينات الغلاف البروتينى، والرنا التابع Satellite RNAs
المقاومة للفطريات	جين الشيتينيز chitinase، وجين الجلوكانيز glucanase، وجين تثبيط بروتينات الريبوسوم (RIP)، وجين مضاد لبروتين الفطريات $RS\text{-}AFP_2$، وجين stilbene synthase، وجينات ميكروبية وأخرى نباتية لكل من الـ osmotin، والـ thionins، والـ lectins، والفيتوألاكسينات phytoalexins، وفوق أكسيد الأيدروجين H_2O_2.
المقاومة للبكتيريا	جين الـ α-thionin من الشعير، وجين البكتيروفاج T4 lysozyme، وجين الـ lysozyme الآدمى.
العقم الذكرى	جينات الـ Barnase والـ barstar، و arg-E، و BCP-I
تحسين القدرة التخزينية	الـ antisense polygalacturonase
نوعية البروتين	جينات الـ phaseolin (من الفاصوليا)، والـ ovalbumin (من الدجاج)، و phytotene synthase الخاص بفيتامين أ
تحمل البرودة	الجين الذى يشفر للـ glycerol-3 phosphate acetyltransferase من الـ *Arabidopsis*
الحماية من الصقيع	جين بروتين مضاد للتجمد antifreeze protein gene من السمك

استعراض للتطبيقات الفعلية للهندسة الوراثية فى الزراعة

نستعرض هنا ما آلت إليه الأوضاع فيما يتعلق بالتطبيقات العملية الفعلية للهندسة الوراثية فى الزراعة، علمًا بأن هذا الأمر آخذ فى التقدم بصورة متسارعة، وأن ما نقدمه من إحصائيات فى هذا المجال ليس أكثر من مؤشر لما كان عليه الحال خلال العقد الماضى (من ١٩٩٦ إلى ٢٠٠٥)، وأن الوضع سوف يختلف قطعًا - بالزيادة - فى المستقبل القريب عما نعرضه الآن.

الأنواع المحصولية التى حولت وراثيًا

إن من أبرز الأمثلة على الأنواع النباتية التى أمكن تحويلها وراثيًّا باستخدام مختلف تقنيات التحويل الوراثى، ما يلى (عن Potrykus وآخرين ١٩٩٨):

١ - التحول الوراثى عن طريق الأجروباكيتريم:

البرسيم الحجازى	التفاح	المشمش
الأسبرجس	القرنفل	الجزر
القنبيط	الكرفس	الحمص
الشيكوريا	الأقحوان	القطن
الخيار	الكتان	الجربيرا
العنب	الكيوى	الخس
الكنتالوب	المسترد	لفت الزيت
الباباظ	البسلة	البيكان
البرقوق	الحور	البطاطس
الأرز	فول الصويا	الفراولة
بنجر السكر	دوار الشمس	الطماطم
التبغ	الجوز	البطيخ

٢ - التحول الوراثى بطريقة القذف المدفعى الدقيق biolistic method:

الشعير	الفاصوليا	القطن
الذرة	الشوفان	لفت الزيت
الباباظ	الفول السودانى	الحور
الأرز	الراى	السورجم
فول الصويا	قصب السكر	دوار الشمس
التبغ	القمح	

٣ - النقل المباشر للجينات إلى البروبلاست:

القطن	البيتونيا	البطاطس
الأرز	التبغ	القمح

وحتى عام ١٩٩٧ تمكن الباحثون من تحويل ما لايقل عن ١٢٠ نوعًا نباتيًا بجينات غريبة عنها (عن Grumet & Gifford ١٩٩٨).

ونقدم – فيما يلى – أمثلة للمحاصيل التى تم تحويلها وراثيًا مصنفة حسب مجموعة النوع المحصولى (.Prog Bot – المجلد ٦٢ لعام ٢٠٠١ – صفحة ١١٦):

١ – الفاكهة:

التفاح – الموز – الكريز – الكرانبرى – العنب – الكيوى – البرتقال – الباباظ – الكمثرى – البرقوق – الراسبرى

٢ – الخضر:

الكنتالوب – الفراولة – الأسبرجس – الفاصوليا – البروكولى – الكرنب – الجزر – القنبيط – الشيكوريا – الخيار – الباذنجان – فجل الحصان – الخس – البسلة – البطاطس – البطاطا – الطماطم – الفلفل.

٣ – الحبوب:

الشعير – الذرة – الأرز – الجاودار (الراى) – السورجم – القمح.

٤ – المحاصيل الحقلية الأخرى:

البرسيم الحجازى – القطن – الكتان – لفت الزيت – فول الصويا – بنجر السكر – قصب السكر – دوار الشمس.

٥ – الأشجار الخشبية:

الكافور – الصنوبر – الحور – البيسية spruce.

٦ – الزهور ونباتات الزينة:

الأقحوان – الجربيرة – البيتونيا – الورد – التجيل – القرنفل – إبرة الراعى (الجيرانيم) geranium – نجمة الصباح morning glory.

٧ – النباتات الطبية

Atropa – العرق سوس licorice.

٨ – نباتات أخرى:

Arabidopsis thaliana.

الإنتاج الزراعي التجاري من المحاصيل المعدلة وراثيًا

كان صنف الطماطم البطئ النضج FlavrSavr أول الأصناف الغذائية المعدلة وراثيًا التي عرضت على جمهور المستهلكين ولاقت إقبالاً كبيرًا في بداية الأمر - ربما لأنها كانت شيئًا جديدًا - إلا أن مبيعاتها انخفضت بشدة خلال فترة وجيزة إلى درجة أن إنتاجها التجاري توقف تمامًا في خلال سنوات قليلة، ولم ينقذ الشركة Calgene - التي أنتجت هذا الصنف - من الإفلاس إلا بشراء شركة Monsanto لها (عن Janick ١٩٩٧).

وحاليًا .. تزرع الولايات المتحدة مساحات شاسعة من الأصناف المحولة وراثيًا من كل من الذرة، وفول الصويا، والقطن، والبطاطس، والتبغ تحمل صفات المقاومة لمبيدات الحشائش والحشرات، والفيروسات، ويتوقع إنتاج المزيد من الأصناف والمحاصيل المهندسة وراثيًا بصورة متزايدة.

لقد بلغت المساحة المزروعة بالأصناف المحولة وراثيًا في عام ١٩٨٨ - أي في بداية العهد بإنتاج تلك الأصناف - أكثر من ٣٥ مليون هكتار، وهي في تزايد مستمر؛ ففي عام ١٩٩٩ بلغ إجمالي المساحة المنزرعة بتلك الأصناف ٤٠ مليون هكتار كان ٧٢٪ منها في الولايات المتحدة فقط، وتلتها الأرجنتين بنسبة ١٦٪، وكندا بنسبة ١٠٪، مع مساحات صغيرة في كل من: الصين، وأستراليا، وجنوب أفريقيا، والمكسيك، وإسبانيا، وفرنسا، والبرتغال، ورومانيا، وأوكرانيا.

وقد توزعت المساحة المنزرعة في عام ١٩٩٩ بين فول الصويا بنسبة ٥٤٪، والذرة بنسبة ٢٨٪، بينما توزعت النسبة المتبقية بين كل من: القطن، ولفت الزيت، والبطاطس، والكوسة، والباباظ. ولقد بلغت المساحة المزروعة بالمحاصيل المحولة وراثيًا في الصين في عام ١٩٩٩ حوالي ٣٠٠٠٠٠ هكتار، مقارنة بنحو ٢٨,٧ مليون هكتار في الولايات المتحدة (عن Ahloowali & Kush ٢٠٠١).

لقد ازدادت المساحات التي خصصت لزراعة المحاصيل المعدلة وراثيًا في الولايات المتحدة زيادة كبيرة بعد وقت قصير من إدخال الأصناف الجديدة المحولة وراثيًا.

فمثلاً ازدادت المساحة التى زرعت بأصناف القطن المعدلة وراثيًا من ١٠٪ فى عام ١٩٩٧ إلى ٢٦٪ فى عام ١٩٩٨، ثم إلى ٤٦٪ فى عام ٢٠٠٠، كذلك ازدادت المساحة التى زرعت بأصناف فول الصويا المحولة وراثيًا من ١٥٪ فى عام ١٩٩٧ إلى أكثر من ٥٠٪ فى عام ٢٠٠٠ (عن Grumet ٢٠٠٢)، ومن المؤكد أن تلك النسب مازالت فى ازدياد.

إن أكثر من ٩٠٪ من المساحة المزروعة بالأصناف المحولة وراثيًا – على المستوى العالمى – تقتصر على ثلاثة محاصيل، هى: فول الصويا، والذرة، والقطن، وهى التى تضاعفت فيها المساحة المزروعة بها ما بين عامى ١٩٩٧، و ١٩٩٨. وفى عام ٢٠٠٠ بلغت المساحة المزروعة بالأصناف المحولة وراثيًا ٤٤.٢ مليون هكتار موزعة على أكثر من ١٣ دولة فى مختلف أنحاء العالم ويشكل فول الصويا – وحده – أكثر من ٥٠٪ من المساحة المنزرعة بالمحاصيل المحولة وراثيًا. وتشكل القاومة لمبيدات الحشائش وللحشرات أهم أهداف الهندسة الوراثية فى النباتات المحولة وراثيًا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

وكما أسلفنا فإن أصناف الذرة وفول الصويا المعدلة وراثيًا تشغل فى الولايات المتحدة الجزء الأكبر من المساحة المزروعة بجميع المحاصيل التى تم تحويلها وراثيًا، فإذا ما علمنا أن منتجات هذين المحصولين (مثل النشا والبروتين والزيت) تدخل فى تكوين ٧٠٪ من الأغذية المصنعة والتى تعرض فى محلات السوبر ماركت بالولايات المتحدة، لأدركنا كيف أن المحاصيل المعدلة وراثيًا أصبحت تستعمل على نطاق واسع للغاية هذا مع العلم بأن فصل الأغذية التى يدخل ضمن مكوناتها محاصيل معدلة وراثيًا عن تلك التى لا يدخل فى تكوينها تلك المحاصيل يضيف نحو ١٠٪ إلى تكلفة الإنتاج (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

وبينما كان حجم السوق العالمية للمحاصيل المحولة وراثيًا ٣ بلايين دولار أمريكى فى عام ٢٠٠٠، فإنه يتوقع أن يصل إلى ٢٥ بليون دولار فى عام ٢٠١٠ (عن Ahloowalia & Khush ٢٠٠١)

هذا ونعرض - فيما يلى - بيانًا بالمساحات التى زرعت عالميًّا بالمحاصيل المعدلة وراثيًّا مقسمة حسب المحصول (جدول ٢٠-٥)، وحسب الصفة التى أجرى التعديل الوراثى من أجلها (جدول ٢٠-٦)؛ الأمر الذى ينعكس على أعداد الاختبارات الحقلية التى أجريت لكل صفة كنسبة مئوية من مجموع حالات التحول الوراثى (جدول ٢٠-٧).

جدول (٢٠-٥): المساحة المزروعة عالميًّا بالنباتات المحولة وراثيًّا فى عامى ١٩٩٨، و ١٩٩٩ (مليون هكتار)

المحصول	١٩٩٨		١٩٩٩		الزيادة	
	المساحة	(%)	المساحة	(%)	المساحة	النسبة
فول الصويا	١٤,٥	٥٢	٢١,٦	٥٤	٧,١	٠,٥
الذرة	٨,٣	٣٠	١١,١	٢٨	٢,٨	٠,٣
القطن	٢,٥	٩	٣,٧	٩	١,٢	٠,٥
لفت الزيت	٢,٤	٩	٣,٤	٩	١,٠	٠,٤
البطاطس	< ٠,١	< ١	< ٠,١	< ١	< ٠,١	—
الكوسة	صفر	صفر	< ٠,١	< ١	—	—
الباباظ	صفر	صفر	< ٠,١	< ١	—	—
الإجمالى	٢٧,٨	١٠٠	٣٩,٩	١٠٠	١٢,١	٠,٤

جدول (٢٠-٦): المساحة الإجمالية المزروعة عالميًّا بالمحاصيل المحولة وراثيًّا مقسمة حسب الصفات التى نقلت إليها.

الصفة	١٩٩٨		١٩٩٩		الزيادة	
	المساحة	(%)	المساحة	(%)	المساحة	%
تحمل مبيدات الحشائش	١٩,٨	٧١	٢٨,١	٧١	٨,٣	٠,٤
المقاومة للحشرات (Bt)	٧,٧	٢٨	٨,٩	٢٢	١,٢	٠,٢
Bt مع المقاومة لمبيدات الحشائش	٠,٣	١	٢,٩	٧	٢,٦	٨,٧
المقاومة للفيروسات وصفات أخرى	< ٠,١	< ١	< ٠,١	< ١	< ٠,١	—
الإجمالى	٢٧,٨	١٠٠	٣٩,٩	١٠٠	١٢,١	٠,٤

جدول (٢٠-٧): أكثر الصفات المحولة وراثيًا انتشارًا فى الاختبارات الحقلية والزراعات التجارية (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الصفة	الاختبارات الحقلية (%) فى الولايات المتحدة (١٩٨٧-١٩٩٧)	المساحة المزروعة تجاريًا بالولايات المتحدة بالمليون هكتار (والنسب المئوية) لسنة ٢٠٠٠
تحمل مبيدات الحشائش	٣٠	٣٢,٧ (٧٤٪)
المقاومة للحشرات	٢٤	٨,٣ (١٩٪)
تحمل مبيدات الحشائش + مقاومة الحشرات		٣,١ (٧٪)
نوعية المنتج	٢١	
المقاومة للفيروسات	١٠	
المقاومة للفطريات	٤	
الصفات المحصولية	٤	
صفات أخرى	٧	

هذا ويلخص جدول (٢٠-٨) الوضع الذى كانت عليه زراعة المحاصيل المعدلة وراثيًا - على المستوى العالمى - فى عام ٢٠٠١.

جدول (٢٠-٨): ملخص بالزراعات التجارية للمحاصيل المعدلة وراثيًا على المستوى العالمى فى عام ٢٠٠١ (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الدولة	المساحة المزروعة بالأصناف المعدلة وراثيًا (مليون هكتار)	النسبة المئوية المعدلة وراثيًا من المساحة الإجمالية المزروعة من المحاصيل التى عدلت وراثيًا بكل دولة
الولايات المتحدة	٣٥,٧	٦٨
الأرجنتين	١١,٨	٢٢
كندا	٣,٢	٦
الصين	١,٥	٣
بقية دول العالم	١,٠	—

المحصول	المساحة المزروعة بالأصناف المعدلة وراثيًا (مليون هكتار)	النسبة المئوية للمساحة المعدلة وراثيًا من المحصول من إجمالى المساحة المزروعة بالأصناف المعدلة وراثيًا كلها
فول الصويا	٣٣,٣	٦٣
الذرة	٩,٨	١٩
القطن	٦,٨	١٣
لفت الزيت	٢,٧	٥

الصفة المعدلة وراثيًا	المساحة المزروعة بالأصناف المعدلة وراثيًا (مليون هكتار)	النسبة المئوية من المساحة الإجمالية المزروعة بالأصناف المعدلة وراثيًا
تحمل مبيدات الحشائش	٤٠,٦	٧٧
مقاومة الحشرات	٧,٨	١٥
مقاومة الحشرات + تحمل مبيدات الحشائش	٤,٢	٨

المحصول	النسبة المئوية من المساحة المعدلة وراثيًا من المحصول من إجمالى المساحة المزروعة بالمحصول عالميًا (وفى الولايات المتحدة)
فول الصويا	٤٦ (٦٨)
القطن	٢٠ (٦٩)
لفت الزيت	١١
الذرة	٧ (٢٦)

ومن بين أبرز الأمثلة على الحالات الأولى للتحولات الوراثية التى تم إطلاقها كأصناف جديدة، ما يلى (عن Dale وآخرين ١٩٩٣):

المحصول	الصفة المنقولة
البرسيم الحجارى	المقاومة لفيرس موزايك البرسيم الحجارى
	المقاومة لفيرس موزايك الخيار
	المقاومة الحشرية بواسطة بروتين اللكتين lectin
	تحمل مبيد الحشائش جلوفوسينيت glufosinate
القاوون	المقاومة لفيرس موزايك الخيار
القنبيط	العقم الذكرى
الشيكوريا	العقم الذكرى
الأقحوان	لون الأزهار
القطن	المقاومة الحشرية بواسطة البروتين Bt
	تحمل مبيد الحشائش بروموكسينيل bromoxynil
	تحمل مبيد الحشائش جلايفوسيت glyphosate
	تحمل مبيد الحشائش سلفونيل يوريا sulfonylurea
الخيار	المقومة لفيرس موزايك الخيار
الكتان	تحمل مبيد الحشائش جلايفوسيت
	تحمل مبيد الحشائش سلفونيل يوريا
الذرة	المقاومة الحشرية بالبروتين Bt
	تحمل مبيد الحشائش جلايفوسيت
	تحمل مبيد الحشائش بروموكسينيل
	تحمل مبيد الحشائش سلفونيل يوريا
	تحمل مبيد الحشائش جلوفوسينيت
	العقم الذكرى
لفت الزيت	المقاومة الحشرية بالبروتين Bt
	تحمل مبيد الحشائش جلوفوسينيت
	تحمل مبيد الحشائش جلايفوسيت
	البروتين المخزن بالبذور
	تركيب الزيت

المحصول	الصفة المنقولة
	العقم الذكرى
الباباظ •	المقاومة لفيرس تبقع البابااظ الحلقى
البطاطس	المقاومة لفيرس إكس البطاطس
	المقاومة لفيرس واى البطاطس
	المقاومة لفيرس التفاف أوراق البطاطس
	المقاومة الحشية بالبروتين Bt
	تحمل مبيد الحشائش بروموكسينيل
	تحمل مبيد الحشائش جلوفوسينيت
	زيادة محتوى النشا
	تحمل مبيد الحشائش سلفونيل يوريا
البرقوق	المقاومة لفيرس plum pox
الأرز	المقاومة الحشرية بالبروتين Bt
	البروتين المخزن بالحبوب
فول الصويا	تحمل مبيد الحشائش جلوفوسينيت
	تحمل مبيد الحشائش جلايفوسيت
	المقاومة لفيرس موزايك فول الصويا
	البروتين المخزن بالبذور
الكوسة	المقاومة لفيرس موزايك الخيار
بنجر السكر	تحمل مبيد الحشائش جلوفوسينيت
دوار الشمس	البروتين المخزن بالبذور
التبغ	المقاومة لفيرس موزايك التبغ
	المقاومة لفيرس tobacco etch
	تحمل مبيد الحشائش سلفونيل يوريا
	تحمل مبيد الحشائش جلوفوسينيت
	تحمل مبيد الحشائش جلايفوسيت
	تحمل مبيد الحشائش بروموكسينيل
	تحمل العناصر الثقيلة
الجوز	المقاومة الحشرية بالبروتين Bt

المحصول	الصفة المنقولة
الطماطم	المقاومة لفيرس موزايك التبغ
	المقاومة لفيرس موزايك الطماطم
	المقاومة الحشرية بالبروتين Bt
	تحمل مبيد الحشائش جلايفوسيت
	تحمل مبيد الحشائش سلفونيل يوريا
	تحمل مبيد الحشائش بروموكسينيل
	تحمل مبيد الحشائش جلوفوسينيت
	نضج الثمار

ومن بين المحاصيل المعدلة وراثيًا التى اعتمد إنتاجها تجاريًا فى الولايات المتحدة، ما يلى (عن Malik ١٩٩٩):

المُنتج	المحصول	الصفة المميزة
Calgene، Monsanto، و Agritope	الطماطم	بطء نضج الثمار
Calgene	القطن	تحمل مبيدات الحشائش
Monsanto	فول الصويا	تحمل مبيدات الحشائش
Calgane	لفت الزيت	جودة الزيت
Upjohn	الكوسة	مقاومة الفيروسات
DNA Plant Technology	الطماطم	بطء نضج الثمار
Monsanto	البطاطس	مقاومة الحشرات
Ciba-Geigy	الذرة	مقاومة الحشرات
Zeneca، و Petoseed	الطماطم	بطء نضج الثمار
AgrEvo، و Del Kalb	الذرة	تحمل مبيدات الحشائش
Monsanto	القطن	مقاومة الحشرات
Monsanto، و DuPont	القطن	تحمل مبيدات الحشائش
Monsanto، و Northrop King	الذرة	مقاومة الحشرات
Plant Genetic Systems	الذرة	العقم الذكرى وتحمل مبيدات الحشائش
جامعة كورنل وجامعة هاواى	الباباظ	مقاومة الفيروسات

ونستعرض – فيما يلى – بيانًا بأعداد الأصناف المعدلة وراثيًا التى أنتجت على المستوى العالمى مصنفة حسب المحصول والهدف من التحول الوراثى (جدول ٢٠-٩)، والدول التى أنتجت فيها تلك الأصناف (جدول ٢٠-١٠)، كما نقدم فى جدولى (٢٠-١١)، و (٢٠-١٢) بيانًا بأسماء الأصناف التى أنتجت فى الولايات المتحدة من مختلف المحاصيل، ومميزاتها، والشركات التى أنتجتها، وفى جدول (٢٠-١٣) بيانًا مماثلاً بالأصناف التى أنتجت فى الاتحاد الأوروبى.

جدول (٢٠-٩): عدد الأصناف المحولة وراثيًا التى تم إنتاجها – لمختلف الأغراض – حتى عام ١٩٩٢ (عن Dale وآخرين ١٩٩٣).

المحصول	مقاومة الأمراض	مقاومة الحشرات	مقاومة الفيروسات	تحمل مبيدات الحشائش	صفات الجودة	الجينات المعلمة	جينات متعددة	غير محددة
البرسيم الحجازى			٤	١٠	٤	١		
التفاح		١						
الأسبرجس						١		
جنس *Brassica*				١				
القاوون			٤	٢				
القنبيط					١			
الشيكوريا					١			
الأقحوان					٢			
القطن		١١		١١				
الخيار			٣					
الكتان				٦		٢		
الخس			١					
الذرة		٥	٤	١٨	١	٧		١
لفت الزيت	١	١	١	٤٥	٢٤	٩		١
الباباظ								١
البيتونيا					٢			
البرقوق						١		
الحور				٧		١		
البطاطس	٤	٢٠	٢٥	١٢	٩	١٥	٤	

تابع جدول (٢٠-٩).

المحصول	مقاومة الأمراض	مقاومة الحشرات	مقاومة الفيروسات	تحمل مبيدات الحشائش	صفات الجودة	الجينات المعلمة	جينات متعددة	غير محددة
الأرز		١			١	٢	١	
فول الصويا				١١	٢			
الكوسة			٣					
بنجر السكر			٧	٢١			١	١
الفراولة		١			١			
دوار الشمس								
التبغ	٦	١٤	٦	٢٦	١١	٢٠		
الطماطم	١	٩	١٤	١٨	١٣	٤		
الجوز		٢						

جدول (٢٠-١٠). عدد الأصناف المحولة وراثيًا والتى اختبرت حقليًا وتم إطلاقها فى مختلف دول العالم حتى عام ١٩٩٢ (عن Dale وآخرين ١٩٩٣).

الدولة	عام أول إطلاق صنفى	عدد الأصناف
الأرجنتين	١٩٩١	٣
أستراليا	١٩٩١	١
بلجيكا	١٩٨٧	٤٢
كندا	١٩٨٨	٥٢
شيلى	١٩٨٧	٤
الصين	١٩٩١	العديد
كوستاريكا	١٩٩١	١
الدانمرك	١٩٩٠	٣
فنلندا	١٩٩٠	٧
فرنسا	١٩٨٦	٨٣
ألمانيا	١٩٩٠	٢
إسرائيل	١٩٩١	١
إيطاليا	١٩٨٩	٢
اليابان	١٩٩١	١

تابع جدول (٢٠-١٠).

الدولة	عام أول إطلاق صنفى	عدد الأصناف
المكسيك	١٩٩١	١
نيوزيلندة	١٩٨٨	٧
إسبانيا	١٩٨٨	٧
السويد	١٩٨٩	٤
سويسرا	١٩٩١	١
هولندا	١٩٨٨	١٢
المملكة المتحدة	١٩٨٧	١٩
الولايات المتحدة	١٩٨٦	١٤١
المجموع	—	٣٩٥

جدول (٢٠-١١): بعض المحاصيل الزراعية المحولة وراثيًا التى أنتجت فى الولايات المتحدة حتى عام ١٩٩٧، والشركات التى قامت بإنتاجها (عن Woodson ١٩٩٧).

المحصول	الصفة/المنتج	الشركة	سنة الإنتاج
الطماطم	الصنف Flavr-Savr	Calgene	١٩٩٤
الكوسة	المقاومة للفيرس	Asgrow	١٩٩٥
الطماطم	تأخير النضج	DNA Plant Tachnology	١٩٩٥
الطماطم	تأخير فقد الصلابة	Zeneca Seeds	١٩٩٥
القطن	المقاومة لمبيد الحشائش Bromoxynil	Calgene	١٩٩٥
فول الصويا	الصنف Roundup Ready	Monsanto	١٩٩٦
القطن	الصنف Bollgard	Monsanto	١٩٩٦
لفت الزيت	الصنف Roundup Ready	Monsanto	١٩٩٦
لفت الزيت	زيوت محورة	Calgene	١٩٩٦
البطاطس	نشا محور	AVEBE	١٩٩٧
الكوسة	المقاومة للفيرس	Asgrow	١٩٩٧
القاوون	المقاومة للفيرس	Asgrow	١٩٩٧

جدول (٢٠-١٢): الأصناف التجارية المعدلة وراثيًا التى أنتجت فى الولايات المتحدة والشركات التى أنتجها (عن Chawla ٢٠٠١).

الصفة	المحصول	الصنف المنتج	الشركة المنتجة
المقاومة للحشرات			
Bt	القطن	Bollguard	Monsanto Co.
Bt	القطن	--	Calgene
Bt	البطاطس	Newleaf	Monsanto Co.
Bt	الذرة	Yield Guard	Monsanto Co.
Bt	الذرة	Maximizer	Ciba Seeds
Bt	الذرة	--	Novartis, Mycogen
			Pioneer Hi-Bred
المقاومة للفيروسات	الكوسة	Freedom II	Asgrow Seeds, Inc.
المقاومة للفيروسات	التبغ والطماطم والفلفل	--	(China)
المقاومة للفيروسات	الكنتالوب	--	Asgrow Seeds, Inc.
تحمل مبيدات الحشائش			
Glufosinate	الذرة	Liberty Link	AgrEvo Canada Inc.
Glufosinate	الذرة	Liberty Link	AgrEvo USA Co.
Sethoxydim	الذرة	--	BASF
Glufosinate	الذرة	--	DeKalb Genetic Corp.
Glyphosate	الذرة	Roundup Ready	Monsanto Co.
Glufosinate	الذرة	--	Plant Genetic Systems
Glufosinate	لفت الزيت	Innovator	AgrEvo Canada Inc.
Glufosinate	لفت الزيت	Innovator	AgrEvo USA Co.
Glyphosate	لفت الزيت	Roundup Ready	Monsanto Co.
Glufosinate	لفت الزيت	--	Plant Genetic Systems
Bromoxynil	لفت الزيت	--	Rhone-Poolene
Bromoxynil	القطن	BXN	Calgene Inc.
Sulfonyl urea	القطن	--	Du Pont
Glyphosate	القطن	Roundup Ready	Monsanto Co.
Glyphosate	فول الصويا	Roundup Ready	Monsanto Co.
Sulfonyl urea	الكتان	Triffid	Univ. of Saskatchewan
Glufosinate	الكرنب	--	Bejo-Zaden

تابع جدول (٢٠-١٢).

الصفة	المحصول	الصنف المنتج	الشركة المنتجة
صفات الجودة			
النضج على النبات والقدرة على التخزين	الطماطم	FlavrSavr	Calgene
النضج على النبات والقدرة على التخزين	الطماطم	Endless Summer	DNA Plant Technology
تأخير فقد الثمار لصلابتها	الطماطم		
زيادة لزوجة المعجون			Zeneca
تعديل النشا	البطاطس		AVEBE
زيادة فترة نضارة الأزهار بعد القطف	الأقحوان		Florigene
تغيرات لونية فى الأزهار	الأقحوان	--	Florigene
صفات الزيت	لفت الزيت	Laurical	Calgene
العقم الذكرى	لفت الزيت	--	Plant Genetics Systems

جدول (٢٠-١٣): بيان بالأصناف المعدلة وراثيًا التى أنتجت فى دول الاتحاد الأوروبى حتى عام ٢٠٠١، والشركات التى قامت بإنتاجها (Prog. Bot. - مجلد ٦٢ لعام ٢٠٠١ - صفحة ١١٣).

الشركة المنتجة	الدولة	المحصول	الصفة	سنة الاعتماد
Seita	فرنسا	التبغ	تحمل مبيدات الحشائش (bromoxynil)	١٩٩٤
Plant Genetic Systems	المملكة المتحدة	لفت الزيت	العقم الذكرى وتحمل مبيدات الحشائش (phosphinothricine)	١٩٩٦
Ciba Geigy	فرنسا	الذرة	المقاومة للحشرات وتحمل مبيدات الحشائش (phosphinothricine)	١٩٩٧
Bejo Zaden B. V.	هولندا	Radicchio	المقاومة للحشرات وتحمل مبيدات الحشائش (phosphinothricine)	١٩٩٦
Monsanto	المملكة المتحدة	فول الصويا	تحمل مبيدات الحشائش (glyphosate)	١٩٩٦
Plant Genetic Systems	فرنسا	لفت الزيت	العقم الذكرى وتحمل مبيدات الحشائش (phosphinothricine)	١٩٩٧

تابع جدول (٢٠-١٣).

الشركة المنتجة	الدولة	المحصول	الصفة	سنة الاعتماد
AgrEvo	المملكة المتحدة	لفت الزيت	تحمل مبيدات الحشائش (phosphinothricine)	١٩٩٨
	فرنسا	الذرة	تحمل مبيدات الحشائش (phosphinothricine)	١٩٩٨
Monsanto	فرنسا	الذرة	المقاومة للحشرات	١٩٩٨
Northrup	المملكة المتحدة	الذرة	المقاومة للحشرات	١٩٩٨
Florigene Europe D. V.	هولندا	القرنفل	تغير لون الزهرة	١٩٩٨
	هولندا	القرنفل	إطالة فترة احتفاظ الأزهار بنضارتها	١٩٩٨
	هولندا	القرنفل	تغيير لون الزهرة	١٩٩٨

أما اليابان – وهى التى كانت من أكثر دول العالم اعتراضًا على استعمال الأصناف المحصولية المعدلة وراثيًا فى الزراعة – فقد صرحت بتداول عديدًا من تلك الأصناف فى الزراعة، كما هو مبين فى جدول (٢٠-١٤).

جدول (٢٠-١٤): قائمة بأسماء المحاصيل المعدلة وراثيًا المسموح باستعمالها كغذاء فى اليابان حتى مايو ١٩٩٧ (عن Malik ١٩٩٩).

المحصول	الشركة المنتجة (والدولة)	الجين المستعمل فى التحول الوراثى
فول الصويا	Monsanto (الولايات المتحدة)	Glyphosate resistance gene
لفت الزيت	Monsanto (كندا)	Glyphosate resistance gene
لفت الزيت	AgrEvo (كندا)	*PAT* gene
لفت الزيت	Plant Genetic Systems (كندا)	*bar* gene male sterile gene
الذرة	Northrup King Company (الولايات المتحدة)	Insect resistance gene (Bt)
الذرة	Ciba-Geigy Corporation (الولايات المتحدة)	Insect resistance gene (Bt)
البطاطس	Monsanto (كندا)	Insect resistance gene (Bt)
الذرة	Monsanto (كندا)	Insect resistance gene (Bt)
البطاطس	Monsanto (كندا)	Insect resistance gene (Bt)
القطن	Monsanto (كندا)	Insect resistance gene (Bt)

تابع جدول (٢٠-١٤).

المحصول	الشركة المنتجة (والدولة)	الجين المستعمل فى التحول الوراثى
لفت الزيت	Hoechst Schering AgrEvo GmbH (ألمانيا)	*PAT* gene
لفت الزيت	Plant Genetic Systems (بلجيكا)	*PAT* gene male sterile gene
لفت الزيت	Plant Genetic Systems (بلجيكا)	*bar* gene male sterile gene
لفت الزيت	Plant Genetic Systems (كندا)	*PAT* gene male sterile gene
لفت الزيت	Hoechst Schering AgrEvo GmbH (ألمانيا)	*PAT* gene

هذا .. ويعطى جدول (٢٠-١٥) حصرًا شاملاً للأغذية المعدلة وراثيًّا المتداولة فى الأسواق، والشركات التى أنتجتها، والهدف من إنتاجها، ومصادر الجينات التى استعملت فى التحول الوراثى بها، والجهات التى قيمتها ورأيها فيها، والأسماء التجارية للأصناف المنتجة (عن Malik ١٩٩٩).

جدول (٢٠-١٥) حصر بالأغذية المعدلة وراثيًا المتداولة بالأسواق

المحصول أو المنتَج	الشركة	الصفة	الهدف	مصدر الجين	الجهة المقيمة ورأيها	الاسم التجارى للصنف أو المنتَج
لفت الزيت	Calgene	تعديل تركيب الزيت - ارتفاع محتوى حامض اللوريك	توسيع مجال الاستعمال فى الصابون والصناعات الغذائية	شجرة California bay tree - لفت الزيت - بكتيريا - فيرس	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Not required	Laurical
الذرة	Ciba-Geigy	المقومة لحافرات الذرة - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	الذرة - بكتيريا - فيرس	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	Matimizer
الذرة	Mycogen	المقاومة لحافرات الذرة - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	الذرة - بكتيريا - فيرس	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	NatureGard
القطن	Calgene/ Rhone Poulenc	المقاومة لبيد الحشائش bromoxynil	مقاومة الحشائش	بكتيريا - فيرس	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	BXN Cotton
القطن	Monsanto	المقاومة لديدان اللوز وديدان البراعم - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	بكتيريا	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	Bollgard
القطن	Monsanto	المقاومة لبيد الحشائش glyphosate	مقاومة الحشائش	*Arabidopsis* - بكتيريا - فيرس	USDA/Approved FDA/Approved FPA/Approved	Roundup Ready

تابع جدول (٢٠-١٥).

المحصول أو المنتج	الشركة	الصفة	الهدف	مصدر الجين	الجهة المقيمة ورأيها	الاسم التجارى للصنف أو المنتج
البطاطس	Monsanto	المقاومة لخنفساء كلورادو - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	بكتيريا	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	New Leaf
فول الصويا	Monsanto	المقاومة لمبيد الحشائش glyphosate	مقاومة الحشائش	البيتونيا - فول الصويا - بكتيريا - فيروسات	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Approved	Roundup Ready
الكوسة	Asgrow	المقاومة لفيروسين	مقاومة الفيروسات	فيروسات	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Not required	Freedom II
الطماطم (شيرى)	Agritope	التحكم فى سرعة النضج	تحسين القيمة التسويقية للمنتج الطازج	بكتيريا	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Not required	
الطماطم	Calgene	التحكم فى سرعة النضج	تحسين القيمة التسويقية للمنتج الطازج	الطماطم - بكتيريا - فيرس	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Not required	Flavr Savr (Mac Gregor)
الطماطم	DNA Plant Technology	التحكم فى سرعة النضج	تحسين القيمة التسويقية للمنتج الطازج	الطماطم - بكتيريا - فيرس	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Not required	Endless Summer

تابع جدول (٢٠-١٥).

المحصول أو المنتج	الشركة	الصفة	الهدف	مصدر الجين	الجهة المقيمة ورأيها	الاسم التجاري للصنف أو المنتج
الطماطم	Monsanto	التحكم فى سرعة النضج	تحسين القيمة التسويقية للمنتج الطازج	بكتيريا	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Not required	
الطماطم	Zeneca/Peto Seed	زيادة سمك الجلد - تغيرات بكتينية	تحسين القيمة التصنيعية	الطماطم - بكتيريا - فيرس	USDA/Approved FDA/Approved EPA/Not required	
Bacillus thuringiensis	Ecogen	السمية لحرشفيات الأجنحة - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	بكتيريا	USDA/ Not required FDA/ Not required EPA/Approved	Crymat
Bacillus thuringiensis	Ecogen	المقاومة لخنفساء كلورادو - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	بكتيريا	USDA/ Not required FDA/ Not required EPA/Approved	Raven
Pseduronas fluorescens	Mycogen	السمية لحرشفيات الأجنحة - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	بكتيريا	USDA/ Not required FDA/ Not required EPA/Approved	M-Peril, M-Trak MVP
Vaccinia virus vaccine	Rhone Merieux	المناعة ضد مرض الكلب	مقاومة وباء مرض الكلب المنقول بالراكون	فيرس الكلب	USDA/ Approved FDA/ Not required EPA/Approved	Raboral

تابع جدول (٢٠-١٥).

المحصول أو المنتج	الشركة	الصفة	الهدف	مصدر الجين	الجهة المقيمة ورأيها	الاسم التجارى للصنف أو المنتج
لفت الزيت	Hoechst/ AgrEvo	المقاومة لمبيد الحشائش glufosinate	مقاومة الحشائش	بكتيريا	USDA/ FDA/ Approved EPA/	
لفت الزيت	Monsanto	المقاومة لمبيد الحشائش glyphosate	مقاومة الحشائش	المعلومة غير متاحة	USDA/ FDA/ Approved EPA/	
لفت الزيت	Plant/Genetic Systems	العقم الذكرى / جين استعادة الخصوبة	تسهيل تربية المحصول	المعلومة غير متاحة	USDA/ FDA/ Approved EPA/	
الذرة	DeKalb	المقاومة لديدان اللوز وديدان البراعم - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية		USDA/ Pending	
الذرة	DeKalb	المقاومة لمبيد الحشائش glufosinate	مقاومة الحشائش	بكتيريا - فيرس	USDA/ Approved FDA/ Approved EPA/	
الذرة	Hoechst/ AgrEvo	المقاومة لمبيد الحشائش glufosinate	مقاومة الحشائش	بكتيريا - فيرس	USDA/ Approved FDA/ Approved EPA/ Pending	
الذرة	Monsato Pioneer	المقاومة لحافرات الذرة - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	بكتيريا	USDA/ Approved FDA/ Approved EPA/ Approved	Yield Gard

تابع جدول (٢٠-١٥)

المحصول أو المنتج	الشركة	الصفة	الهدف	مصدر الجين	الجهة المقيمة ورأيها	الاسم التجارى للصنف أو المنتج
الدرة	Plant Genetic Systems	العقم الذكرى	تسهيل تربية المحصول	بكتيريا - فيرس	USDA/ Approved FDA/ Approved EPA/ Approved	
الذرة	Sandoz/ Northrup King	المقاومة لحافرات الذرة - سُم الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	بكتيريا	USDA/ Approved FDA/ Approved EPA/ Pending	
الذرة	DuPont	المقاومة لمبيد الحشائش sulfonylurea	مقاومة الحشائش	التبغ - بكتيريا	USDA/ Approved FDA/ Approved EPA/ Approved	
الذرة	Monsanto	المقاومة لمبيد الحشائش Glyphosate/ مقاومة حفار الدرة			USDA/ Pending FDA/ Approved EPA	
لفت الزيت	Plant Genetic Systems	العقم الذكرى / جين استعادة الخصوبة	تسهيل تربية المحصول		USDA FDA/ Approved EPA	
فول الصويا	DuPont	تعديل تركيب الزيت			USDA/ Pending	
البابايا	Cornell Univ., Univ. of Hawaii	المقاومة للفيروسات	مقاومة الفيروسات		USDA/ Approved FDA/ EPA / Not required	

تابع جدول (٢٠-١٥).

المحصول أو المنتج	الشركة	الصفة	الهدف	مصدر الجين	الجهة المقيمة ورأيها	الاسم التجارى للصنف أو المنتج
فول الصويا	Hoechst/ AgrEvo	القاومة لبيد الحشائش glufosinate	مقاومة الحشائش	بكتيريا	USDA/ Approved FDA EPA/ Pending	
الكوسة	Asgrow/ Seminis	القاومة لثلاثة فيروسات	مقاومة الفيروسات	بكتيريا - فيرس	USDA/ Approved FDA EPA/ Not required	
Bacillus thiuringiensis	Ecogen	السمية لحرشفيات الأجنحة - سُمّ الـ Bt	مقاومة الآفات الحشرية	بكتيريا	USDA/ Not required FDA/ Not required EPA/ Pending	
Rhizobium meliloti	Research Seeds	زيادة القدرة على تثبيت آزوت الهواء الجوى	زيادة محصول البرسيم الحجازى	بكتيريا	USDA/ Not required FDA/ Not required EPA/ Pending	
الذرة	Monsanto	القاومة لبيد الحشائش glyphosate			USDA/ Pending	

USDA: وزارة الزراعة الأمريكية، و FDA: إدارة الغذاء والدواء بالولايات المتحدة، و approved: مصدق عليه، و pending: فى انتظار استكمال إجراءات التصديق، و not required: التصديق عليه غير ضرورى.



مصادر الكتاب

الرفاعي، عبدالرحيم توفيق، وسمير عبدالرازق الشوبكي (٢٠٠٢). تقنيات القرن ٢١ لتحسين النبات باستخدام زراعة الأنسجة. دار الفكر العربي – القاهرة – ٦٠٢ صفحة.

حسن، أحمد عبدالمنعم (٢٠٠٥). الأسس العامة لتربية النبات. الدار العربية للنشر والتوزيع – القاهرة – ٤٧٧ صفحة.

Agrawal, R. L. 1998. Fundamentals of plant breeding and hybrid seed production. Science Pub., Inc., Enfield, New Hampshire, USA. 394 p.

Ahloowalia, B. S. 1998. In vitro Techniques and mutagensis for the improvement of vegetatively propagated plants, pp. 293-309. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Ahloowalia, B. S. and G. S. Khush. 2001. Renaissance in genetics and its impact on plant breeding. Euphytica 118: 99-102.

Ahrenholtz, I., K. Harms, J. de Vries, and W. Wackernagel. 2000. Increased killing of *Bacillus subtilis* on the hair roots of transgenic T4 lysozyme-producing potatoes. Applied and Environmental Microbiology 66(5): 1862-1865.

Alhert, H. and D. W. Ow. 1998. Recombinase-mediated gene integration in plants, pp. 501-516. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Allefs, S. J. H. M., E. R. De Jong, D. E. A. Florack, C. Hoogendoorn, and W. J. Stiekema. 1996. *Erwinia* soft rot resistance of potato cultivars expressing antimicrobial peptide tachyplesin I. Molecular Breeding 2(2): 97-105.

Alsanius, B., M. Hultberg, and J. E. Englund. 2002. Effect of lacZY-marking of the 2,4-diacetyl-phloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*-strain 5-2/4 on its physiological performance and root colonization ability. Microbiological Research 157(1):39-45.

Altman, A. (ed.). Agricultural Biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y. 769 p.

American Society for Horticultural Science. 1998. The impact of biotechnology on the environment. HortScience 33(4): 607-631.

Ammirato, P. V., D. A. Evans, W. R. Sharp. and Y. Yamada. (eds.). 1984. Handhook of plant cell culture. Vol. 3. Crop species. Macmillan Pub. Co., N. Y. 620 p.

Anderson, E. J., D. M. Stark, R. S. Nelson, P. A. Powell, N. E. Tumer. and R. N. Beachy. 1989. Transgenic plants that express the coat protein genes of tobacco mosaic virus or alfalfa mosaic virus interfere with disease development of some nonrelated viruses. Phytopathology 79: 1284-1290.

Aragao, F. J. L., L. M. G. Barros, M. V. de Sousa, M. F. G. de Sa, E. R. P. Almeida, E. S. Gander, and E. L. Rech. 1999. Expression of a methionine-rich storage albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K., Lecythidaceae) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). Genetics and Molecular Biology 22(3): 445-449.

Arunachalam, V. and S. Chandrashekaran. 1993. RFLP approach to breeding for quantitative traits in plants — a critique. Journal of Genetics 72(2/3): 73-83.

Atkinson, H. J., P. E. Urwin, and M. J. McPherson. 2003. Engineering plants for nematode resistance. Ann. Rev. Phytopahol. 41: 615-639.

Ayotte, R., P. M. Harney, and V. S. Machado. 1987. The transfer of triazine resistance from *Brassica napus* L. to *B. oleracea* L. I. Production of F_1 hyhrids through embryo rescue. Euphytica 36: 615-624.

Ayub, R., M. Guis, M. Ben Amor, L. Gillot, J. P. Roustan, A. Latché, M. Bouzayen, and J. C. Peach. 1996. Expressinn of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. Nature Biotechnology 14(7): 862-866.

Bachem, C. W. B., G. J. Speckmann, P. C. G. van der Linde, F. T. M. Verheggen, M. D. Hunt, J. C. Steffens, and M. Zabeau. 1994. Antisense

expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. Bio/Technology 12(11): 1101-1105.

Bajaj, Y. P. S. 1989. Genetic engineering and in vitro manipulation of plant cells - technical advances, pp. 1-20. In: Y. B. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol 9: Plant protoplasts and genetic engineering II. Springer-Verlag, Berlin.

Bajaj, Y. P. S. 1989. Recent advances in the isolation and culture of protoplasts and their implications in crop improvement, pp. 3-22. In: Y. P. S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. vol. 8. Plant protoplasts and genetic engineering I. Springer-Verlag, Berlin.

Bajaj, Y. P. S. 1990. In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding, pp. 3-44. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 12. Haploids in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin.

Bajaj, Y. P. S. 1990. Somaclonal variation — origin, induction, cryopreservation, and implications in plant hreeding, pp. 3-48. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. II. Somaclonal variation in crop improvement I. Springer — Verlag, Berlin.

Bajaj, Y. P. S. 1994. Somatic hybridization — a rich source of genetic variability, pp. 3-32. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 27. Somatic hybridization in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin.

Bajaj, Y. P. S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity, pp. 3-28. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 32. Cryopreservation of plant germplasm I. Springer-Verlag, Berlin.

Bajaj, Y. P. S., S. K. Mahajan, and K. S. Labana. 1986. Interspecific hybridization of *Brassica napus* and *B. Juncea* through ovary, ovule, and embryo culture. Euphytica 35: 103-109.

Baldwin, E. A. 2002. Commercialized hiotechnology, food for thought: introduction to the collequium, HortScience 37(3): 446-447.

Beachy, R. N., S. Loesch-Fries, and N. E. Tumer. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. Ann. Rev. Phytopath. 28: 451-474.

Ben Amor, M., J. M. Lelièvre, M. Bouzayen, A. Latché, J. C. Pech, B. Flores, and F. Romojaro. 1998. Ethylene-inhibited cantaloupe charantais melons exhibit resistance to chilling injury, p. 31. Abstract in: COST 915; Consumer oriented quality improvement of fruit and vegetable products. Abstracts of papers presented. Polytechnic University of Madrid, Spain.

Bent, A. F. and I. C. Yu. 1999. Applications of molecular biology to plant disease and insect resistance. Adv. Agron. 66: 251-298.

Bergelson, J., J. Winterer, and C. B. Purrington. 1999. Ecological impacts of transgenic crops, pp. 325-343.

Bhat, S. R. 2000. Plant transformation for directed genetic change, pp. 439-459. In: V. L. Chopra. (ed.). Plant breeding: theory and practice (2nd ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt Ltd., New Delhi, India.

Bhat, S. R. and V. L. Chopra. 2000. plant biotechnology and biosafety, pp. 473-486. In: V. L. Chopra. (ed.). Plant breeding: theory and practice (2nd ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt Ltd., New Delbi, India.

Bhojwani, S. S. and A. P. Raste. 1996. *In vitro* pollination and fertilization, pp. 237-262. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1. Fundamentals aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1983. Plant rissue culture: theory and practice. Elsevier, Amsterdam. 502 p.

Birch, A. N. E., I. E. Geoghegan, M. E. N. Majerus, J. W. McNicol, C. A. Hackett, A. M. R. Gatehouse, and J. A. Gatehouse. 1999. Tri-Trophic interactions involving pest aphids, predatory 2-spot ladybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop lectin for aphid resistance. Molecular Breeding 5(1): 75-83.

Block, M. de. 1993. The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. Euphytica 71: 1-14.

Bloksberg, L. N. and M. E. Saltveit, Jr. 1986. Regeneration of plants from axillary buds of harvested and stored heads of field-grown Iceberg lettuce. HortScience 21: 1201-1203.

Bordas, M., C. Montesinos, M. Dabauza, A. Salvador, L. A. Roig, R. Serrano, and V. Moreno. 1997. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. Transgenic Research 6(1): 41-50.

Bosch, D., J. Smal, and E. Krebbers. 1994. A trout growth hormone is expressed, correctly folded and partially glycosylated in the leaves but not the seeds of transgenic plants. Transgenic Research 3(5): 304-310.

Bottino, P. J. 1981. Vegetable crops, pp. 141-164. In: B. V. Conger (ed.). Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Bourgeais, P., G. Guerrier, and D. G. Strullu. 1987. Adaptation of *Lycopersicon esculentum* to NaCl: a comparative study of cultures of callus or stem tips. Canad. J. Bot. 65: 1989-1997.

Brar, D. S. and S. M. Jain. 1998. Samaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement, pp. 15-37. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Brazolot, J., K. F. Yu, and K. P. Pauls. 1994. *In vitro* selection for disease/toxin resistance, pp. 87-97: in: R. A. Dixon and R. A. Gonzales. (eds.). Plant cell culture: a practical approach. (2nd ed.). Oxford University Press, Oxford, UK.

Bretting, P. K. and M. P. Widrlechner. 1995. Genetic markers and horticultural germplasm management. HortScience 30(7): 1349-1356.

Bridgen, M. P. 1994. A review of plant embryo culture. HortScience 29(11): 1243-1246.

Briggs, S. P. 1992. Identification and isolation of agronomically important genes from plants, pp. 373-387. In: H. T. Stalker and J. P. Murphy. (eds.). Plant breeding in the 1990s. CAB International, Wallingford, UK.

Bright, S., V. Jarrett, R. Nelson, G. Grissen, A. Karp, J. Franklin, P. Norbury, J. Kueh, S. Rognes, and B. Miflin. 1983. Modification of agronomic traits using in vitro technology, pp. 251-265. In: S. H. Mantell and H. Smith. (eds.). Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.

Broglie, R. and K, Broglie. 1993. Chitinase gene expression in transgenic plants: a molecular approach to understanding plant defense responses. Phyilosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 342(1301): 265-270.

Broglie, R. and K. Broglie. 1994. Chitinase gene expression in transgenic plants: a molecular approach to understanding plant defence responses, pp. 77-82. In: M. W. Bevan. B. D. Harrison, and C. J. Leaver. (eds.). The production and uses of genetically transformed plants. Chapman & Hall Ltd., London.

Broglie, K., R. Broglie, N. Benhamou, and I. Chet. 1993. The role of cell wall degrading enzymes in fungal disease resistance, pp. 139-156. In: I. Chet. (ed.). Biotechnology in plant disease control. Wiley-Liss Inc., N. Y.

Brown, T. A. 1986. Gene cloning. Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd., Wokingham, UK. 234 p.

Buiatti, M. and P. Bogani. 1995. Physiological complexity and plant genetic manipulation. Euphytica 85: 135-147.

Cailloux, M. 1984. Plant tissue culture: rapid propagation, induced mutations, and the potential role of protoplast techniques, pp. 311-346. In: P. B. Vose and S. G. Blixt. (eds.). Crop breeding: a temporary basis. Pergamon Pr., N. Y.

Caplan, A., P. H. Berger, and M. Naderi. 1998. Phenotypic variation between transgenic plants: what is making gene expression unpredictable ?, pp. 539-562. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Carlson, P. S., B. F. Conrad, and J. D. Lutz. 1984. Sorting through the variability. HortScience 19: 388-392.

Carozzi, N. and M. Koziel. (eds.). 1997. Advances in insect control: The role of transgenic plants. Taylor & Francis Ltd., London. 301 p.

Cassells, A. C. 1998. In vitro production of pathogen- and contaminant-free plants, pp. 43-56. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Catch, E. W., R. L. Hellmich, and G. P. Munkvold. 2002. A comparison of maize stalk rot occurrence in Bt and non-Bt hybrids. Plant Dis. 86: 1149-1155.

Chahal, G. S. And S. S. Gosal. 2002. Principles and procedures of plant breeding. Alpha Science International Ltd., Pangbourne, UK. 604 p.

Charcosset, A. And L. Moreau. 2004. Use of molecular markers for the development of new cultivars and the evaluation of genetic diversity. Euphytica 137: 81-94.

Chawla, H. S. 2000. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire. 368 p.

Chen, Q., G. Jelenkovic, C. K. Chin, S. Billings, J. Eberhardt, and J. C. Goffreda. 1995. Transfer and transcriptional expression of coleopteran cryIII B endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* in eggplant. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120(6): 921-927.

Chen, W. S., C. C. Chiu, H. Y. Liu, T. L. Lee, J. T. Cheng, C. C. Lin, Y. J. Wu, and H. Y. Chang. 1998. Gene transfer via pollen-tuhe pathway for anti-*Fusarium* wilt in watermelon. Biochemistry and Molecular Biology International 46(6): 1201-1209.

Chilton, S. 1997. Genetic engineering of plant secondary metabolism for insect protection, pp. 237-269. In: N. Carozzi and M. Koziel. (eds.). Advances in insect control: The role of Transgenic plants. Taylor & Francis Ltd., London.

Chong, D. K. X. and W. H. R. Langridge. 2000. Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants. Transgenic Research 9(1): 71-78.

Chong, D. K. X., W. Roherts, T. Arakawa, K. Illes, G. Bagi, C. W. Slattery, and W. H. R. Langridge. 1997. Expression of the human milk protein â-casein in transgenic potato plants. Transgenic Research 6(4): 287-296.

Chopra, V. L. (ed.). 2000. Plant breeding: theory and practice. (2nd ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India.

Chopra, V. L., V. S. Malik, and S. R. Bhat. 1999. (eds.). Applied plant biotechnology. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA. 384 p.

Chrispeels, M. J. 1997. Transfer of bruchid resistance from the common bean to other starchy grain legumes by genetic engineering with the á-amylase inhibitor gene, pp. 139-156. In: N. Carozzi and M. Koziel. (eds.). Advances in insect control: The role of transgenic plants. Taylor & Francis Ltd., London.

Chrispeels, M. J. and D. E. Sadava. 2003. Plants, genes, and crop biotechnology. (2nd ed.). American Society of Plant Biologists, Boston. 562 p.

Christopher, T. and M. V. Rajam. 1996. Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46(3): 245-250.

Christou, P. 1994. The biotechnology of crop legumes. Euphytica 74: 165-185.

Chu, C. C. 1978. The N_6 medium and its applications to anther culture of cereal crops, pp. 43-45. In: Proceedings of the symposium on plant tissue culture. Science Press, Peking.

Chu, C. C. 1982. Haploids in plant improvement, pp. 129-158. In: I. K. Vasil, W. R. Scowcroft, and K. J. Frey. (eds.). Plant improvement and Somatic cell genetics. Academic Press, N. Y.

Connett, R. J. A. and P. D. Barfoot. 1992. The development of genetically modified varieties of agricultural crops by the seeds industry, pp. 45-73. In: A. M. R. Gatehouse, V. A. Hilder, and D. Boulter. (eds.). 1992. Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, Wallingford, UK.

Cooking, E. C. 1975. Plant protoplasts as genetic systems, pp. 311-327. In: L. Ledoux. (ed.). Genetic manipulations with plant material. Plenum Pr., N. Y.

Cooking, E. C. 1983. Genetic transformation through somatic

hybridisation, pp. 241-250. In: S. H. Mantell and H. Smith. Plant Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.

Cooking, E. C. and R. Riley. 1981. Application of tissue culture and somatic hybridization to plant improvement, pp. 85-116. In: K. J. Frey. (ed.). Plant breeding II. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Corbin, D. R., J. T. Greenplate, and J. P. Purcell. 1998. the identification and development of proteins for control of insects in genetically modified crops. 1998. HortScience 33(4): 614-617.

Coughlan, S. J. and A. J. Kinney. 2002. Transgenic plants as sources of modified oils, pp. 305-321. In: K. M. Oksman-Caldentery and W. H. Barz. (eds.). Plant biotechnology and transgenic plants. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Coury, D. A. and K. A. Feldmann. 1998. T-DNA insertion mutagensis and the untagged mutants, pp. 517-538. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Culter, A. J., M. Saleem, E. Kendall, L. V. Gusta, F. Georges, and G. L. Fletcher. 1989. Winter flounder antifreeze protein improves the cold hardiness of plant tissues. J. Plant Physiol. 135(3): 351-354.

Czapla, T. 1997. Plant lectins as insect control proteins in transgenic plants, pp. 123-138. In: N. Carozzi and M. Koziel. (eds.). Advances in insect control: The role of Transgenic plants. Taylor & Francis Ltd., London.

Dale, P. J. and J. A. Irwin. 1995. the release of transgenic plants from containment, and the move towards their widespread use in agriculture. Euphytica 85: 425-431.

Dale, P. J., J. A. Irwin, and J. A. Scheffler. 1993. The experimental and commercial release of transgenic crop plants. Plant breeding 111: 1-22.

Daub, M. E. 1984. a cell culture approach for the development of disease resistance: studies on the phytotoxin cercosporin. HortScience 19: 382-387.

Day, P. R. 1980. Tissue culture methods in plant breeding, p. 223-231. In: D. S. Ingram and J. P. Helgeson. (eds.). Tissue culture methods for plant pathologists. Blackwell Sci. Pub., Oxford.

Dessalegne, L., A. C. Wetten, and P. D. S. Caligari. 1997. Production of transgenic tomatoes expressing oxalate oxidase. Acta Horticulturae No. 447: 457-458.

Dhawan, V. 1993. Tissue culture of hardwood species, pp. 43-71. In: J. Prackash and R. L. M. Pierik. (eds.). Plant biotechnology. Science Publishers, NH, USA.

Dickinson, M. 2003. Molecular plant pathology. BIOS Scientific Publishers, London. 244 p.

Ding, L. C., C. Y. Hu, K. W. Yeh, and P. J. Wang. 1998. Development of insect-resistant cauliflower plants expressing the trypsin inhibitor gene isolated from local sweet potato. Plant Cell Reports 17(11): 854-860.

Dixon, R. A. (ed.). 1985. Plant cell culture: a practical approach. IRL Press, Oxford. 236 p.

Dixon, R. A. and R. A. Gonzales. (eds.). 1994. Plant cell culture: a practical approach. (2nd ed.). Oxford University Press, Oxford.

Dodds, J. H. 1985. Fusion of plant protoplasts, pp. 17-25. In: J. H. Dodds. (ed.). Plant genetic engineering. Cambridge Univ. Pr., Cambridge.

Dodds, J. H. (ed.). 1985. Plant genetic engineering. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 295 p.

Donegan, K. K., D. L. Schaller, J. K. Stone, L. M. Ganio, G. Reed, P. B. Hamm, and R. J. Seidler. 1996. Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* endotoxin. Transgenic Research 5(1): 25-35.

Downing, K. J. and J. A. Thomson. 2000. Introduction of the *Serratia marcescens* chiA gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the control of phytopathogenic fungi. Canad. J. Microbiol. 46(4): 363-369.

Dracup, M. 1993. Why does in vitro cell selection not improve the salt

tolerance of plants ?, pp. 137-142. In: P. J. Randall, E. Dehaize, R. A. Richards, and R. Munns. (eds.). Genetic aspects of plant mineral nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Duck, N. and S. Evola. 1997. Use of transgenes to increase host plant resistance to insects: Opportunities and challenges, pp. 1-20. In: N. Carozzi and M. Koziel. (eds.). Advances in insect control: The role of Transgenic plants. Taylor & Francis Ltd., London.

Duncan, D. R. and J. Widholm. 1986. Cell selection for crop improvement. Plant Breed. Rev. 4: 153-173.

Duncan, D. R., D. Hammond, J. Zalewski, J. Cudnohufsky, W. Kaniewski, M. Thornton, J. T. Bookout, P. Lavrik, G. J. Rogan, and J. Feldman-Riebe. 2002. Field performance of transgenic potato, with resistance to Colorado potato beetle and viruses. HortScience 37(2): 275-276.

Dunwell, J. M. 1985. Haploid cell cultures, pp. 21-36. In: R. A. Dixon. (ed.). Plant cell culture: a practical approach. IRL Press, Oxford.

Dunwell, J. M. 1996. Microspore culture, pp. 205-216. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1. Fundamental aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Earle, E. D. and V. E. Gracen. 1981. The role of protoplasts and cell cultures in plant disease research, pp. 285-297. In: R. C. Staples and G. H. Toenniessen. (eds.). Plant disease control: resistance and susceptibility. Wiley, N. Y.

Ebida, A. I. A. and A. M. El-Gamal. 1992. In vitro propagation and tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) Alex. J. Agr. Res. 37(1): 275-300.

Ebida, A. I. A. and C. Y. Hu. 1993. An efficient and rapid technique for *in vitro* propagation and tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) via sprout discs. Egypt. J. Appl. Sci. 8(4): 103-132.

El-Bahr, M. K., S. A. Ghanem, A. Abo-Shady, M. A. Hamoud, and M. M. Saker. 1993. Salt tolerance in tomato tissue cultures. I. Selection of NaCl tolerant line of cultured cells. Egypt. J. Hort. 20(2): 323-336.

Estili, S. and N. Ficcadenti. 1996. Irradiated pollen for haploid production, pp. 263-274. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1. Fundamental aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Estrella, A. H. and I. Chet. 1998. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi, pp. 263-282. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Evans, D. A., W. R. Sharp, and C. E. Flick. 1981. Plant regeneration from cell cultures. Hort. Rev. 3: 214-314.

Ezura, H., H. Amagi, K. Yoshioka, and K. Oasawa. 1992. Highly frequent appearance of tetraploidy in regenerated plants, a universal phenomenon, in tissue cultures of melon (*Cucumis melo* L.). Plant Science (Limerick) 85(2): 209-213.

Fassuliotis, G. and B. V. Nelson. 1988. Interspecific hybrids of *Cucumis metuliferus* x *C. anguria* obtained through embryo culture and somatic embryogensis. Euphytica 37: 53-60.

Feng, D. X., L. Deslandes, H. Keller, F. Revers, B. Favery, P. Lecomte, J. Hirsch, J. Olivier, and Y. Marco. 2004. Isolation and characterization of a novel *Arabidopsis thaliana* mutant unable to develop wilt synptoms after inoculation with a virulent strain of *Ralstonia solanacearum*. Phytopathology 94: 289-295.

Finnegan, J. and D. McElroy. 1994. Transgene inactivation: plants fight back ! Bio/Technology 12(9): 883-889.

Fischhoff, D. A., K. S. Bowdish, F. J. Perlak, P. G. Marrone, S. M. McCormick, J. G. Niedermeyer, D. A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer, D. E. Rochester, S. G. Rogers, and R. T. Fraley. 1987. Insect tolerant trangenic tomato plants. Bio/Technology 5: 807-813.

Fitchen, J. H. and R. N. Beachy. 1993. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. Ann. Rev. Microbiol. 47: 739-763.

Flavell, R. B. 1982. Recognition and modification of crop plant genotypes using techniques of molecular biology, pp. 277-291. In: I. K. Vasil, W.

R. Scowcroft, and K. J. Frey. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, N. Y.

Flavell, R. B. 1992. The value of model systems for the future plant breeder, pp. 409-419. In: H. T. Stalker and J. P. Murphy. (eds.). Plant breeding in the 1990s. CAB International, Wallingford, UK.

Fobes, J. F. 1987. Progress in tomato biotechnology. Acta Hort. 2000: 91-95.

Frahm, C., S. Mahmoodzadeh, and M. Meixner. 1998. Transposable elements and genetic variation, pp. 563-594. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Franks, T. and R. G. Birch. 1991. Microprojectile techniques for direct gene transfer into intact plant cells, pp. 103-127. In: D. R. Murray. (ed.). Advanced methods in plant breeding and biotechnology. CABI, Wallingford, UK.

Galun, E., D. Aviv, and A. Perl. 1994. Cybridization in potato, pp. 167-182. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 27. Somatic hybridization in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Galun, E., D. Aviv, Y. Mahler-Slasky, S. Galili, A. Perl, R. Aly, and S. Wolf. 1997. Defense against pathogenic bacteria in transgenic potato plants. Acta Horticulturae No. 447: 423-429.

Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrition requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50: 151-158.

Gardner, E. J., M. J. Simmons, and D. P. Sunstad. 1991. Principles of genetics. (8^{th} ed.). John Wiley & Sons, Inc., N. Y. 649 p.

Gatehouse, J. A. 1991. Breeding for resistance to insects, pp. 250-276. In: D. R. Murray. (ed.). 1991. Advanced methods in plant breeding and biotechnology. CAB International, Wallingford, UK.

Gatehouse, A. M. R. 1999. Biotechnological applications of plant genes in the productioon of insect-resistant crops, pp. 263-280. In: S. L. Clement

and S. S. Quisenberry. (eds.). Global plant genetic resources for insect-resistant crops. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Gatehouse, A. M. R., V. A. Hilder, and D. Boulter. (eds.). 1992. Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, Wallingford, UK. 266 p.

Gatehouse, A. M. R., D. Boulter, and V. A. Hilder. 1992. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance, pp. 155-181. In: A. M. R. Gatehouse, V. A. Hilder, and D. Boulter. (eds.). 1992. Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, Wallingford, UK.

Gatehouse, A. M. R., Y. Shi, K. S. Powell, C. Brough, V. A. Hilder, W. D. O. Hamilton, C. A. Newell, A. Merryweather, D. Boulter, and J. A. Gatehouse. 1993. Approaches to insect resistance using transgenic plants. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Bilogical Sciences 342(1301): 279-286.

Gatehouse, A. M. R., R. E. Down, K. S. Powell, N. Sauvion, Y. Rahbé, C. A. Newell, A. Merryweather, W. D. O. Hamilton and J. A. Gatehouse. 1996. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae.* Entomologia Experimentalis et Applicata 79(3): 295-307.

Gatehouse, A. M. R., G. M. Davison, C. A. Neweli, A. Merryweather, W. D. O. Hamilton, E. P. J. Burgess, R. J. C. Gilbert, and J. A. Gatehouse. 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. Molecular Breedingg 3(1): 49-63.

Gaynor, J. J. and R. Kaur-Shawhney. 1985. Production of novel crops by somatic hybridization, pp. 15-24. In: C. A. Neyra. (ed.). Biochemical basis of plant breeding. Vol. 1. Metabolism. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

George, R. A. T. (ed.). 1986. Technical guideline on seed potato micropropagation and multiplication. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 55 p.

Giles, K. L., J. P. Ranch, and D. D. Songstad. 1993. Plant tissue-culture techniques in plant breeding, pp. 169-195. In: J. Prackash and R. L. M. Pierik. (eds.). Plant biotechnology. Science Publishers, NH, USA.

Gisbert, C., A. M. Rus, M. C. Bolarin, J. M. Lpez-Coronado, I. Arrillaga, C. Montesinos, M. Caro, S. Serrano, and V. Moreno. 2000. The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. Plant Physiology 123(1): 393-402.

Gonzales, R. A. and J. M. Widholm. 1985. Selection of plant cells for desirable characteristics: inhibitor resistance, pp. 67-68. In: R. A. Dixon. (ed.). Plant cell culture: a practical approach. IRL Pr., Oxford.

Good, X., J. A. Kellogg, W. Wagoner, D. Langhoff, W. Matsumara, and R. K. Bestwick. 1994. Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. Plant Molecular Biology 26(3): 781-790.

Grant, J. E., E. M. Dommisse, M. C. Christey, and A. J. Conner. 1991. Gene transfer to plants using *Agrobacterium*, pp. 50-73. In: D. R. Murray. (ed.). 1991. Advanced methods in plant breeding and biotechnology. CAB International, Wallingford, UK.

Grather, O. and B. Schneider. 2001. The metabolic diversity of plant cell and tissue culture. Progress in Botany 62: 266-304.

Gray, D. J., S. Jayasankar, and Z. T. Li. 2005. A simple illumination system for visualizing green fluorescent protein, pp. 273-276. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray. (eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Gray, D. J., M. E. Compton, E. Hiebert, C. M. Lin, and V. P. Gaba. 2005. Construction and use of a simple gene gun for particle bombardment, pp. 265-272. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray. (eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Gressel, J. 1993. Advances in achieving the needs for biotechnologically-derived herbicide resistant crops. Plant Breed. Rev. 11: 155-198.

Gressel, J. 1998. Biotechnology of weed control, pp. 295-325. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Gressel, J. 2002. Transgenic herbicide-resistant crops - advantages, drawbacks, and failsafes, pp. 597-633. In: K. M. Oksman-Caldentery and W. H. Barz. (eds.). Plant biotechnology and transgenic plants. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Grierson, D. 1991. Biotecbnology of vegetable crops. HortScience 26(8): 1025-1028.

Grierson, D. and R. Fray. 1994. Control of ripening in transgenic tomatoes. Euphytica 79: 251-263.

Griesbach, R. J. 1984. An introduction to somatic cell genetics HortScience 19: 367-371.

Grosser, J. W. 1994. Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion, and culture. HortScience 29(11): 1241-1242.

Grumet, R. 1990. Genetically engineered plant virus resistance. HortScience 25(5): 508-513.

Grumet, R. 1995. Genetic engineering for crop virus resistance. HortScience 30(3): 449-445.

Grumet, R. 2002. Plant biotechnology in the field–A snapshot with emphasis on horticultural crops. HortScience 37(3): 435-436.

Grumet, R. and F. Gifford. 1998. Plant biotechnology in the United States: issues and challenges en route to commercial production. HortScience 33(2): 187-192.

Guenthner, J. F. 2002. Consumer acceptance of genetically modified potatoes. Amer. J. Potato Res. 79: 309-316.

Guis, M., R. Botondi, M. Ben-Amor, R. Ayub, M. Bouzayen, J. C. Pech, and A. Latche. 1997. Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe charantais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122(6): 748-751.

Gulati, A. and P. K. Jaiwal. 1997. Tbe potential of plant tissue culture and related techniques for tbe improvement of salt tolerance in higher plants, pp. 321-363. In: P. K. Jaiwal, R. P. Singh, and A. Gulati. (eds.).

Strategies for improving salt tolerance in higher plants. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.

Gupta, P. K. 1998. Chromosomal basis of somaclonal variation in plants, pp. 149-168. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Gusta, L. V., R. W. Wilen, and P. Fu. 1996. Low-temperature stress tolerance: the role of abscisic acid, sugars, and heat-stable proteins. HortScience 31(1): 39-44.

Hancock, J. F., R. Grumet, and S. C. Hokanson. 1996. The opportunity for escape of engineered genes from transgenic crops. HortScience 31(7): 1080-1085.

Hanson, M. R., M. A. O'Connell, and C. Vidair. 1989. Somatic hybridization in tomato, pp. 320-335. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 8. Plant protoplasts and genetic engineering I. Springer-Verlag, Berlin.

Harbers, D. J. 1969. A simple effective embryo culture technique for *Brassica*. Euphytica 18: 425-429.

Hartmann, H. T. and D. E. Kester. 1983. Plant propagation: principles and practices. Prentices/Hall International, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 727 p.

Hauptli, H., D. Katz, B. R. Thomas, and R. M. Goodman. 1990. Biotechnology and crop breeding for sustainable agriculture, pp. 141-156. In: C. A. Edwards, R. Lal, P. Madden, R. H. Miller, and G. House. (eds.). Sustainable agricultural systems. Ankeny, Iowa, USA.

Hedden, P., J. P. Coles, A. L. Phillips, S. G. Thomas, D. A. Ward, I. S. Curtis, J. B. Power, K. C. Lowe, and M. R. Davey. 1998. Modification of plant morphology by genetic manipulation of gibberellin biosynthesis, pp. 205-217. In: E. K. Cockshull, D. Gray, G. B. Seymour, and B. Thomas. (eds.). Genetic and environmental manipulation of horticultural crops. CABI Publishing, Wallingford , UK.

Helentjaris, T. G. 1992. RFLP analysis for manipulating agronomic traits

in plants, pp. 357-372. In: H. T. Stalker and J. P. Murphy. (eds.). Plant breeding in the 1990s. CAB International, Wallingford, UK.

Helgeson, J. P. 1980. Plant tissue and cell suspension culture, pp. 19-25. In: D. S. Ingram and J. P. Helgeson. (eds.). Tissue culture methods for plant pathologists. Blackwell Sci. Pub., Oxford.

Hellwege, E. M., S. Czapla, A. Jahnke, L. Willmitzer, and A. G. Heyer. 2000. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 97(15): 8699-8704.

Henry, R. J. 1998. Molecular and biochemical characterization of somaclonal variation, pp. 485-499. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Herbers, K. and U. Sonnewald. 1998. Transgenic plants in biochemistry and plant physiology. Prog. Bot. 59: 534-569.

Hightower, R., C. Baden, E. Penzes, P. Lund, and P. Dunsmuir. 1991. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. Plant Molecular Biology 17(5): 1013-1021.

Hilder, V. A., A. M. R. Gatehouse, and D. Boulter. 1990. Genetic engineering of crops for insect resistance using genes of plant origin, pp. 51-66. In: G. W. Lycett and D. Grierson. Genetic engineering of crop plants. Butterworths, London.

Hong, K. H., Y. H. Om, and H. G. Park. 1994. 1994. Interspecific hybridization between *Cucurbita pepo* and *C. moschata* through ovule culture. (In Korean with English summary). J. Korean Soc. Hort. Sci. 35(5): 438-448. c. a. Plant Breed. Abstr. 65: 6399; 1995.

Hopkins, W. G. 1995. Introduction to plant physiology. John Wiley & Sons, Inc., N. Y. 464 p.

Horsch, R. B. 1993. Commercialization of genetically engineered crops. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 342(1301): 287-291.

Hossain, M., S. Imanishi, and A. Matsumoto. 1994. Production of somatic hybrids between tomato (*Lycopersicon esculentum*) and night shade (*Solanum lycopersicoides*) by electrofusion. Breeding Science 44(4): 405-412.

Hussey, G. 1980. *In vitro* propagation, pp. 51-91. In: D. S. Ingram and J. P. Helgeson. (eds.). Tissue culture methods for plant pathologists. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

Hussey, G. 1983. *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops, pp. 111-138. In: S. H. Mantell and H. Smith. (ed.s). Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.

Imai, R., L. Chang, A. Ohita, E. A. Bray, and M. Takagi. 1996. A LEA-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 170(2): 243-248.

Ingram, D. S. and J. P. Helgeson. (eds.). 1980. Tissue culture methods for plant pathologists. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 272 p.

Ishimoto, M., T. Sato, M. J. Chrispeels, and K. Kitamura. 1996. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed á-amylase inbibitor of common bean. Entomologia Experimentalis et Applicata 79(3): 309-315.

Jackson, S. D., A. Heyer, J. Dietze, and S. Prat. 1996. Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. Plant Journal 9(2): 159-166.

Jacobs, M., M. Vauterin, E. Dewaele, and A. Craciun 2002. Engineering plant biochemical pathways for improved nutritional quality, pp. 233-253. In: K. M. Oksman-Caldentery and W. H. Barz. (eds.). Plant biotechnology and transgenic plants. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Jahne, A., D. Becker, and H. Lorz. 1995. Genetic engineering of cereal crop plants: a review. Euphytica 85: 35-44.

Jain, S. M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153-166.

Jain, S. M., S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). 1996. *In vitro* haploid

production in higher plants. Vol. 1. Fundamental aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. 339 p.

Jain, S. M., D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). 1998. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrech, the Netherlands. 615 p.

Jain, S. M., B. S. Ahloowalia, and R. E. Veilleux. 1998. Somaclonol variation in crop improvement, pp. 203-218. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Janick, J. 1997. What's hot, What's not: introduction to the workshop. HortScience 32(6): 1005-1006.

Jansson, C. and P. Maenpaa. 1999. Nuclear and plastomic transformation of higher plants using microprojectile bombardment. Prog. Bot. 60: 88-98.

Jayasankar, S. 2005. Variation in tissue culture, pp. 301-309. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray. (eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Jayasankar, S. and D. J. Gray. 2005. *In vitro* plant pathology, pp. 293-299. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray. (eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press, Boea Raton, Florida.

Jensen, C. J. 1981. Uses of cell and tissue culture techniques in plant breeding and genetics, pp. 87-104. In: K. O. Rachie and J. M. Lyman (eds.). Genetic engineering for crop improvement. The Rockefeller Foundation.

Jeske, H. 2002. Transgenic plants with increased resistance and tolerance against viral pathogens, pp. 517-548. In: K. M. Oksman-Caldentery and W. H. Barz. (eds.). Plant bioteehnology and transgenic plants. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

John, I., R. Drake, A. Farrell, W. Cooper, P. Lee, P. Horton, and D. Grierson. 1995. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. Plant Journal 7(3): 483-490.

Johri, B. M., P. S. Srivastava, and A. P. Raste. 1980. Endosperm culture, pp. 157-182. In: I. K. Vasil. (ed.). Prespectives in plant cell and tissue culture. Academic Press, N. Y.

Jongedijk, E., H. Tigelaar, S. C. van Roekel, S. A. Bres-Vloemans, I. Dekker, P. J. M. Van den Elzen, J. C. Cornelissen, and L. S. Melchers. 1995. Synergistic activity of chitinases and â-1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 85(1/3): 173-180.

Jourdan, P. 1994. Resynthesis of *Brassica napus* through protoplast fusion between *B. oleracea* and *B. rapa*, pp. 295-304. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 27. Somatic hybridization in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin.

Kahl, G., D. Kaemmer, J. Weising, S. Kost, F. Weigand, and M. C. Saxena. 1994. The potential of gene technology and genome analysis for cool season food legume crops: theory and practice. Euphytica 73: 177-189.

Kalloo. 1988. Vegetable breeding. Vol. III. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 174 p.

Kane, M. E. 2005. Shoot culture procedures, pp. 145-157. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray. (eds.). Plant development and hiotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Kao, K. N. and M. R. Michayluk. 1989. Fusion of protoplasts — techniques, p. 277-288. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 8. Plant protoplasts and genetic engineering I. Springer-Verlag, Berlin.

Kapusta, J., A. Modelska, M. Figlerowicz, T. Pniewski, M. Letellier, O. Lisowa, V. Yusibov, H. Koprowski, A. Plucienniczak, and A. B. Legocki. 1999. A plant-derived edible. vaccine against hepatitis B virus. FASEB Journal 13(13): 1796-1799.

Karp, A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. Euphytica 85: 295-302.

Kato, T., E. Asamizu, Y. Nakamura and S. Tabata. 2003. Genome analysis of a flowering plant, *Arabidopsis thaliana*, pp. 3-18. In: Biotechnology in

agriculture and forestry, vol. 52. Brassicas and legumes. Springer-Verlag, Berlin.

Kaur, R., D. R. Sharma, and K. Kumar. 2000. Biotechnological approaches — Applications in crop improvement, pp. 183-210. In: S. K. Gupta. (ed.). Plant breeding: theory and techniques. Agrobios (India), Jodhpur.

Kaur-Sawhney, R., P. B. Applewhite, and A. W. Galston. 1996. Formation *in vitro* of ripe tomato fruits from thin layer explants of flower pedicels. Plant Growth Regulation 18(3): 191-199.

Keller, E. R. J. and L. Korzun. 1996. Ovary and ovule culture for haploid production, pp. 217-235. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1. Fundamental aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Kelly, J. D. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. HortScience 30(3): 461-465.

Kelly, J. D. and P. N. Miklas. 1999. Marker-assisted selection, pp. 93-123. In: S. Singh. (ed.). Common bean improvement in the twenty-first century. Kluwer Academic Publications, Dordrecht, Netherlands.

Kalaitzes, P., S. M. Koehler, and M. L. Tucker. 1995. Cloning of a tomato polygalacturonase expressed in abscission. Plant Molecular Biology 28(4): 647-656.

Kavanagh, T. A. and C. Spillane. 1995. Strategies for engineering virus resistance in transgenic plants. Euphytica 85: 149-158.

Kempken, F. 1997. Biotechnology with plants — an overview. Prog. Bot. 58: 428-440.

Kempken, F. 2001. Plant biotechnology: transgenic crops for the third millennium. Prog. Bot. 62: 114-139.

Khush, G. S. and S. S. Virmani. 1996. Haploids in plant breeding, pp. 11-33. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1. Fundamental aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Kieffer, M., M. P. Fuller, and A. J. Jellings. 1995. Rapid mass production of cauliflower propagules from fractionated and graded curd. Plant Science (Limerick) 107(2): 229-235.

Kikkert, J. R. 1993. The Biolistic? PDS-1000/He device. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33(3): 221-226.

King, G. J. 1990. Molecular genetics and breeding of vegetable brassicas. Euphytica 50: 97-112.

Kisaka, H., H. Lee, M. Kisaka, A. Kanno, K. Kang, and T. Kameya. 1994. Production and analysis of a symmetric hybrid plants between monocotyledon (*Oryza sativa* L.) and dicotyledon (*Daucus carota* L.). Theorelical and Applied Genetics 89(2/3): 365-371.

Kitto, S. L. 1997. Commercial micropropagation. HortScience 32(6): 1012-1014.

Klee, H. J. and D. G. Clark. 2002. Manipulation of ethylene synthesis and perception in plants: The ins and outs. HortScience 37(3): 450-452.

Klein, T. M., R. Arentzen, P. A. Lewis, and S. Fitzpatrick-McElligot. 1992. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. Bio/Technology 10(3): 286-291.

Kozai, T. 1991. Acclimatization of micropropagated plants, pp. 127-141. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 17. High-tech and micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin.

Koziel, M. G., N. B. Carozzi, and G. W. Warren. 1998. Transgenic plants for the control of insect pests, pp. 283-294. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Kramer, M. G. and K. Redenbaugh. 1994. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The Flavr Savr™ tomato story. Euphytica 79: 293-297.

Kramer, K. J., S. Muthukrishnan, L. Johnson, and F. White. 1997. Chitinases for insect control, pp. 185-193. In: N. Carozzi and M. Koziel. (eds.). Advances in insect control: The role of Transgenic plants. Taylor & Francis Ltd., London.

Kuginuki, Y., T. Miyajima, H. Masuda, K. I. Hida, and M. Hirai. 1999. Highly regenerative cultivars in microspore culture in *Brassica oleracea* L. var. *capitata*. Breeding Science 49(4): 251-256.

Kuipers, A. G. J., W. J. J. Soppe, E. Jacobsen, and R. G. F. Visser. 1994. Field evaluation of transgenic potato plants expressing an antisense granule-bound starch synthase gene: increase of the antisense effect during tuber growth. Plant Molecular Biology 26(6): 1759-1773.

Kurz, W. G. W. and F. Constabel. 1998. Production of secondary metabolites, pp. 183-224. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Larkin, P. J. 1998. Introduction, pp. 3-13. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.

Lavigne, C., J. L. Millecamps, H. Manac'h, P. Cordonnier, A. Matejicek, J. Vasseur, and J. Gasquez. 1994. Monogenic semidominant sulfonylurea resistance in a line of white chicory. Plant Breeding 113(4): 305-311.

Law, C. N. 1995. Genetic manipulation in plant breeding — prospects and limitations. Euphytica 85: 1-12.

Ledoux. L. (ed.). 1975. Genetic manipulations with plant material. Plenum Pr., N. Y. 601 p.

Lee, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. Adv. Agron. 55: 265-344.

Leike. H. and W. Bauch. 1992. Micropropagation of hybrid lines in vegetable breeding, pp. 3-25. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 19. High-tech and micropropagation III. Springer-Verlag, Berlin.

Li, R. G. and Y. L. Fan. 1999. Reduction of lesion growth rate of late blight plant disease in transgenic potato expressing harpin protein. Science in China Series C — Life Sciences 42(1): 96-101.

Limon, M. C., J. A. Pintor-Toro, and T. Benitez. 1999. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. Phytopathology 89: 254-261.

Lindow, S. 1996. Theory and application of genetic engineering for stress resistance and avoidance. HortScience 31(1): 47-49.

Llewellyn, D. and T. J. V. Higgins. 2002. Transgenic crop plants with increased tolerance to insect pests, pp. 571-595. In: K. M. Oksman-Caldentery and W. H. Barz. (eds.). Plant biotechnology and transgenic plants. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Lomonossoff, G. P. 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. Ann. Rev. Phytopathol. 33: 323-343.

Lorito, M., S. L. Woo, I. G. Fernandez, G. Colucci, G. E. Harman, J. A. Pintor-Toro, E. Filippone, S. Muccifora, C. B. Lawrence, A. Zoina, S. Tuzun, and F. Scala. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(14): 7860-7865.

Lorz, H. 1985. Isolated cell organells and subprotoplasts: their roles in somatic cell genetics, pp. 27-59. In: J. H. Dodds. (ed.). Plant genetic engineering. Cambridge Univ. Pr., Cambridge.

Love, S. L. 1994. Ecological risk of growing transgeic potatoes in the United States and Canada. American Potato Journal 71(10): 647-658.

Lycett, G. W. and D. Grierson. 1990. (ed.). Genetic engineering of crop plants. Butterworths, London. 293 p.

Maliga, P., L. Menczel, V. Sidorov, L. Marton, A. Csepl, P. Medgyesy, T. M. Dung, G. Lazar, and F. Nagy. 1982. Cell culture nutants and their uses, pp. 221-237. In: I. K. Vasil, W. R. Scowcroft, and K. J. Frey. (eds.). Plant improcment and somatic cell genetics. Academic Press, N. Y.

Malik, V. S. 1999. Biotechnology: multibillion dollar industry, pp. 1-69. In: V. L. Chopra, V. S. Malik, and S. R. Bhat (eds.). Applied plant biotechnology. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.

Maluszynski, M., I. Szarejko, and B. Sigurbjornsson. 1996. Haploidy and

mutation techniques, pp. 67-93. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1. Fundamental aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Mandaokar, A. D., P. A. Kumar, V. S. Malik, and R. P. Sharma. 1999. Bt-Transgenic crop plants: progress and prospects, pp. 285-324, In: V. L. Chopra, V. S. Malik, and S. R. Bhat (eds.). Applied plant biotechnology. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA.

Mantell, S. H. and H. Smith. (eds.). 1983. Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. 334 p.

Mantell, S. H., J. A. Matthews, and R. A. McKee. 1985. Priciples of plant biotechnology: an introduction to genetic engineering in plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 269 p.

Martineau, B., K. R. Summerfelt, D. F. Adams, and J. W. DeVerna. 1995. Production of high solids tomatoes through molecular modification of levels of the plant growth regulator cytokinin. Bio/Technology 13(3): 250-254.

McCown, B. H. 2003. Biotechnology in horticulture: 100 years of application. HortScience 38(5): 1026-1030.

McDaniel, R. G. 1981. Plant genetic engineering: possibilities for organelle transfer, pp. 185-205. In: K. O. Rachie and J. M. Lyman. (eds.). Genetic engineering for crop improvement. The Rockefeller Foundation.

McPartlan, H. C. and P. J. Dale. 1994. An assessment of gene transfer by pollen from field-grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. Transgenic Research 3(4): 216-225.

Meiri, H. and A. Altman. 1998. Agriculture and agricultural biotechnology: development trends toward the 21st century, pp. 1-17. in: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Metz, P. L. J., J. P. Nap, and W. J. Stiekema. 1995. Hybridization of radish (*Raphanus sativus* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) through a flower-culture method. Euphytica 83: 159-168.

Meyer, P. 1995. Variation of trnsgene expression in plants. Euphytica 85: 359-366.

Micallef, B. J., K. A. Haskins, P. J. Vanderveer, K. S. Roh, C. K. Shewmaker, and T. D. Sharkey. 1995. Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have increased capacity for sucrose synthesis. Planta 196(2): 327-334.

Michelmore, R. 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. Ann. Rev. Phytopath. 15: 393-427.

Millam, S., L. A. Payne, and G. R. Mackay. 1995. The integration of protoplast fusion-derived material into a potato breeding programme — a review of progress and problems. Euphytica 85: 451-455.

Miller, W. A., G. Koev, and B. R. Mohan. 1997. Are there risks associated with transgenic resistance to luteoviruses. Plant Disease 81(7): 700-710.

Moffat, A. S. 1995. Exploring transgenic plants as a new vaccine source. Science (Washington) 268(5211): 658, 660.

Mok, D. W. S., M. C. Mok, A. Rabakoarihanta, and C. T. Shii. 1986. *Phaseolus*: Wide hybridization through embryo culture, pp. 309-318. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 2. Crops I. Springer-Verlag, Berlin.

Mora, A. A. and E. D. Earle. 2001. resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harziaum* endochitinase gene. Molecular Breeding 8(1): 1-9.

Morel, G. 1972. The impact of plant tissue culture on plant breeding, pp. 185-194. In: F. G. H. Lupton, G. Jenkins, and R. Johnson. (eds.). The way ahead in plant breeding. The Plant Breeding Institute, Cambridge.

Mount, M. S. and P. M. Berman. 1994. Genetic manipulation of plants to improve psotharvest disease resistance. HortScience 29(7): 762-768.

Mullineaux, P. M. 1992. Genetically engineered plants for herbicide resistance, pp. 75-107. In: A. M. R. Gatehouse, V. A. Hilder, and D. Boulter. (eds.). 1992. Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, Wallingford, UK.

Murashige, T. 1974. Plant Propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobabcco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Murata, N., H. Wada, T. Sakamoto, T. Tasaka, Z. Gombos, B. Y. Moon, P. Deshnium, D. A. Los, and H. Hayashi. 1996. Genes for fatty acid desaturases and choline oxidase are responsible for tolerance to low-temperature and salinity stresses in cyanobacteria and plants, pp. 55-63. In: S. Grillo and A. Leone. (eds.). Physical stresses in plants: genes and their products for tolerance. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Nadolska-Orczyk, A. and S. Malepszy. 1989. *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L. 7. Genes controlling plant regeneration. Theoretical and Applied Genetics 78(6): 836-840.

Nakata, P. A. and T. W. Okita. 1994. Studies to enhance starch biosynthesis by manipulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes, pp. 31-44. In: W. R. Belknap, M. E. Vayda, and W. D. Park. (eds.). The molecular and cellular biology of the potato. CABI International, Wallingford, UK.

Namba, S., K. Ling, C. Gonsalves, J. L. Slightom, and D. Gonsalves. 1992. Protection of transgenic plants expressing the coat protein gene of watermelon mosaic virus II or zucchini yellow mosaic virus agaunst six potyviruses. Phytopathology 82: 940-946.

Nascari, G. and C. Montanelli. 1997. The genetic engineering approach for the control of plant diseases, pp. 89-111. In: R. K. Upadhyay and K. G. Mukerji. (eds.). Toxins in plant disease development and evolving biotechnology. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, USA.

Nelson, R. S., P. A. Powell, and R. N. Beachy. 1990. Coat Protein-mediated protection against virus infection, pp. 13-24. In: G. W. Lycett and D. Grierson. Genetic engineering of crop plants. Butterworths, London.

Nicholl, D. S. 1994. An introduction to genetic engineering. Cambridge University Press, Cambridge. 168 p.

Nishiwaki, M., K. Fujino, Y. Koda, K. Masuda, and Y. Kikuta. 2000. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. Planta 211(5): 756-759.

Nitsch, C. 1975. Single cell culture of an haploid cell: the microspore, pp.

297-310. In: L. Ledoux (ed.). Genetic manipulations with plant material. Plenum Press, N. Y.

Ohsumi, C., A. Kojima, K. Hinata, T. Etoh, and T. Hayashi. 1992. Interspecific hybrids between onion and garlic, pp. 233-239. In: P. Hanlet, K. Hammer, and H. Knupffer. (eds.). the genus *Allium*: taxonomic problems and genetic resources. Institut fur Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Germany.

Oksman-Caldentery, K. M. and W. H. Barz. (eds.). 2002. Plant biotechnology and transgenic plants. Marcel Dekker, Inc., N. Y. 719 p.

Oldroyd, G. E. D. and B. J. Staskawicz. 1998. Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. Proc. Nat. Aca. Sci. U. S. 95(17): 10300-10305.

Osusky, M., G. Q. Zhou, L. Osuska, R. E. Hancock, W. W. Kay, and S. Misra. 2000. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. Nature Biotechnology 18(11): 1162-1166.

Owens, L. D. 1995. Overview of gene availability, identification, and regulation. HortScience 30(5): 957-961.

Panopoulos, N. T. (ed.). 1981. Genetic engineering in plant sciences. Praeger Pub., N. Y. 271 p.

Paranjothy, K. 1993. Tissue culture of palms, pp. 73-83. In: J. Prackash and R. L. M. Pierik. (eds.). Plant biotechnology. Science Publishers, NH, USA.

Paul, J. 1970. Cell and tissue culture (2nd ed.). Churchill Livingstone, London. 430 p.

Pauls, K. P. 1996. The utility of doubled haploid populations for studying the genetic control of traits determinated by recessive alleles, pp. 125-144. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1. Fundamentals aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Peferoen, M. 1992. Engineering of insect-resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene, pp. 135-153. In: A. M. R. Gatehouse,

V. A. Hilder, and D. Boulter. (eds.). 1992. Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, Wallingford, UK.

Peferoen, M. 1997. Insect control with transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* crystal proteins, pp. 21-48. In: N. Carozzi and M. Koziel. (eds.). Advances in insect control: The role of Transgenic plants. Taylor & Francis Ltd., London.

Perrin, Y., C. Vaquero, I. Gerrard, M. Sack, J. Drossard, E. Stoger, P. Christou, and R. Fischer. 2000. Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFV) antibody used in cancer diagnosis and therapy. Biologia Plantarum 43(3): 345-352.

Persley, G. J. 1997. Global comcernes and issues in biotechnology. HortScience 32(6): 977-979.

Pharr, D. M., J. M. H. Stoop, J. D. Williamson, M. E. Studer Feusi, M. O. Massel, and M. A. Conkling. 1995. The dual role of mannitol as osmoprotectant and photoassimilate in celery. HortScience 30(6): 1182-1188.

Pierik, R. L. M. 1993. Micropropagation: technology and opportunities, pp. 9-22. In: J. Prackash and R. L. M. Pierik. (eds.). Plant biotechnology. Science Publishers, NH, USA.

Plader, W., S. Malepszy, W. Burza, and Z. Rusinowski. 1998. The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.). Euphytica 103: 9-15.

Potrykus, I., R. Bilang, J. Futterer, C. Sautter, M. Schrott, and G. Spangenberg. 1998. Genetic engineering of crop plants, 119-159. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Power, J. B. and J. V. Chapman. 1985. Isolation, culture, and genetic manipulation of plant protoplasts, pp. 37-66. In: R. A. Dixon. (ed.). Plant cell culture: a practical approach. IRL Press, Oxford.

Prakash, J. and R. L. M. Pierik. (eds.). 1993. Plant biotechnology: commercial prospects and problems. Science Publishers, Inc., NH, USA. 289 p.

Prakash, J., B. P. Singh, A. Prathibha, S. Prakash, and M. C. Gayatbri.

1993. Production of disease-free plants through tissue culture, pp. 133-142. In: J. Prackash and R. L. M. Pierik. (eds.). Plant biotechnology. Science Publishers, NH, USA.

Pueyo, J. J. and A. Hiatt. 1998. Production of foreign compounds in transgenic plants, pp. 251-261. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Punja, Z. K. and S. H. T. Raharjo. 1996. Response of transgenic cucumber and carrot plants expressing different chitinase enzymes to inoculation with fungal pathogens. Plant Disease 80(9): 999-1005.

Rachie, K. O. and J. M. Lyman. (eds.). Genetic engineering for crop improvement. The Rockeffeller Foundation. 254 p.

Raghavan, V. 1993. Embryo culture: methods and applications, pp. 143-168. In: J. Prackash and R. L. M. Pierik. (eds.). Plant biotechnology. Science Publishers, NH, USA.

Rajesh Luthra, V., R. K. Dubey, A. K. Srivastava, and S. Kumar. 1997. Microprojectile mediated plant transformation: a bibliographic search. Euphytica 95: 269-294.

Rao, P. S. and P. Suprasanna. 1996. Methods to double haploid chrosome numbers, pp. 317-339. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1. Fundamentals aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Rathus, C. and R. G. Birch. 1991. Electroporation for direct transfer into plant protoplasts, pp. 74-102. In: D. R. Murray. (ed.). 1991. Advanced methods in plant breeding and biotechnology. CAB International, Wallingford, UK.

Reavy, B. and M. A. Mayo. 1992. Genetic engineering of virus resistance, pp. 183-214. In: A. M. R. Gatehouse, V. A. Hilder, and D. Boulter. (eds.). 1992. Plant genetic manipulation for crop protection. CAB International, Wallingford, UK.

Redenbaugh, K., J. Fujii, D. Slade, P. Viss, and M. Kossler. 1991. Artificial seeds — encapsulated somatic embryos, pp. 395-416. In: Y. P. S. Bajaj.

(ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 17. High-tech and micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin.

Reeck, G. R., K. J. Kramer, J. E. Baker, M. R. Kanost, J. A. Fabrick, and C. A. Behnke. 1997. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects, pp. 157-183. In: N. Carozzi and M. Koziel. (eds.). Advances in insect control: The role of Transgenic plants. Taylor & Francis Ltd., London.

Reed, B. M. 2002. Implementing cryopreservation for long-term germplasm preservation in vegetatively propagated species, pp. 22-33. In: L. E. Towill and Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 50. Crypreservation of plant germplasm II. Springer-Verlag, Berlin.

Reed, S. M. 2005. Embryo rescue, pp. 235-239. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray. (eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Reed, S. M. 2005. Haploid cultures, pp. 225-234. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray. (eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Reinert, J. and M. M. Yeoman. 1982. Plant cell and tissue culture: a laboratory manual. Springer-Verlag, Berlin. 83 p.

Rekoslavskaya, N. I., V. M. Zhukova, E. G. Chekanova, R. K. Salyaev, S. P. Mapelli, and L. V. Gamanets. 1999. Auxin Status of transformed *Solanum* plants in relation to their tolerance to 2,4-D and productivity. Russian Journal of Plant Physiology 46(5): 609-619.

Remotti, P. C. 1998. Somaclonal variation and *in-vitro* selection for crop improvement, pp. 169-201. In: S. M. Jain, D. S. Brar, and B. S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherands.

Richards, H. A., L. C. Hudson, M. D. Halfhill, and C. N. Stewart, Jr. 2005. Genetically modified plant controversies: sensational headlines versus sensible research. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray. (eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Ricton, S., J. E. Gray, and D. Grierson. 1995. The manipulation and modification of tomato fruit ripening by expression of antisense RNA in transgenic plants. Euphytica 85: 193-202.

Riddick, E. W., G. Dively, and P. Barbosa. 2000. Season-long abundance of generalist predators in transgenic versus non-transgenic potato fields. Journal of Entomological Science 35(4): 349-359.

Rober, M., K. Geider, B. Muller-Rober, and L. Willmitzer. 1996. Synthesis of fructans in tubers of transgenic starch-deficient potato plants does not result in an increased allocation of carbohydrates. Planta 199(4): 528-536.

Rommens, C. M. T., J. M. Salmeron, G. E. D. Oldroyd, and B. J. Staskawicz. 1995. Intergeneric transfer and functional expression of the tomato disease resistance gene Pto. Plant Cell 7(10): 1537-1544.

Rotino, G. L., E. Perri, M. Zottini, H. Sommer, and A. Spena. 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. Nature Biotechnology 15(13): 1398-1401.

Roush, R. T. 1994. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays ?. Biocontrol Science and Technology 4(4): 501-516.

Roush, R. 1997. Managing resistance to transgenic crops, pp. 271-294. In: N. Carozzi and M. Koziel. (eds.). Advances in insect control: The role of Transgenic plants. Taylor & Francis Ltd., London.

Rugh, C. L., G. M. Gragson, R. B. Meagher, and S. A. Merkle. 1998. Toxic mercury reduction and remediation using transgenic plants with a modified bacterial gene. HortScience 33(4): 618-621.

Ryan, C. A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defense against insects and pathogens. Ann Rev. Phytopath. 28: 425-449.

Sakamoto, K. and T. Taguchi. 1994. Somatic hybridization between tomato (*Lycopersicon esculentum*) and pepino (*Solanum muricatum*), pp. 244-254. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and

forestry, vol. 27. Somatic hybridization in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin.

Sala, F., B. Parisi, R. Cella, and O. Ciferri. 1980. Plant cell cultures: results and perspectives. Elsevier, Amsterdam. 433 p.

Sanders, P. R., B. Sammons, W. Kaniewski, L. Haley, J. Layton, B. J. LaVallee, X. Delannay, and N. E. Tumer. 1992. Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes. Phytopathology 82: 683-690.

Santaniello, V., R. E. Evenson, and D. Zilberman. (ed.). 2002. Market development for genetically modified food. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK. 318 p.

Sautter, C. 1993. Development of a microtargeting device for particle bombardment of plant neristems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33(3): 251-257.

Sautter, C., N. Leduc, R. Bilang, V. A. Iglesias, A. Gisel, X. Wen, and I. Potrykus. 1995. Shoot apical meristems as a target for gene transfer by microballistics. Euphytica 85: 45-51.

Schaafsma, A. W., D. C. Hooker, T. S. Baute, and L. Illincic-Tamburic. 2002. Effect of Bt-corn hybrids on deoxynivalenol content in grain at harvest. Plant Dis. 86: 1123-1126.

Scbell, J. et al. 1982. Plant cell transformations and genetic engineering. In: I. K. Vasil, W. R. Scowcroft, and K. J. Frey. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, N. Y.

Schieder, O. 1982. Somatic hybridization: a new method for plant improvement, pp. 239-253. In: I. K. Vasil, W. R. Scowcroft, and K. J. Frey. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic press, N. Y.

Schloupf, R. M., S. A. Barringer, and W. E. Splittstoesser. 1995. A review of hyperhydricity (vitrification) in tissue culture. Plant Growth Regulator Society of America Quarterly 23(3): 149-158.

Schmidt, R., A. Acarkan, K. Boivin, O. Clarenz, and M. Rossberg. 2003. The sequence of the *Arabidopsis* genome as a tool for comparative

structural genomics in Brassicaceae, pp. 19-39. In: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 52. Brassicas and legumes. Springer-Verlag, Berlin.

Scholthof, K. B. G., H. B. Scholthof, and A. O. Jackson. 1993. Control of plant virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants. Plant Physiol. 102: 7-12.

Schuch, W., J. Kanczler, D. Robertson, G. Hobson, G. Tucker, D. Grierson, S. Bright, and C. Bird. 1991. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. HortScience 26(12): 1517-1520.

Schulman, A. H. 2002. Transgenic plants as producers of modified starch and other carbohydrates, pp. 255-282. In: K. M. Oksman-Caldentery and W. H. Barz. (eds.). Plant biotechnology and transgenic plants. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Scowcroft, W. R. 1982. Somatoclonal variation: a new option for plant improvement, pp. 159-179. In: I. K. Vasil, W. R. Scowcroft, and K. J. Frey. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, N. Y.

Scragg, A. H. 1998. Large-scale plant tissue culture, pp. 225-249. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Serrano, C., P. Arce-Johnson, H. Torres, M. Gebauer, M. Gutierrez, M. Moreno, X. Jordana, A. Venegas, J. Kalazich, and L. Holuigue. 2000. Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. American Journal of Potato Research 77(3): 191-199.

Shade, R. E., H. E. Schroeder, J. J. Pueyo, L. M. Tabe, L. L. Murdock, T. J. V. Higgins, and M. J. Chrispeels. 1994. Transgenic pea seeds expressing the á-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. Bio/Technology 12(8): 793-796.

Shakraborty, S., N. Chakraborty, and A. Datta. 2000. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(7): 3724-3729.

Sharma, D. R., R. Kaur, and K. Kumar. 1996. Embryo rescue in plants — a review. Euphytica 89: 325-337.

Sherraf, I., S. Tizoutine, M. H. Chaput, M. Allot, I. Mussio, D. Sihachakr, L. Rossignol, and G. Ducreux. 1994. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids through protoplast electrofusion between potato (*Solanum tuberosum*) and *Lycopersicon pennellii*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37(2): 137-144.

Shewry, P. R. 2002. Improving the nutritional quality and functional properties of seed proteins by genetic engineering, pp. 283-304. In: K. M. Oksman-Caldentery and W. H. Barz. (eds.). Plant biotechnology and transgenic plants. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Sihachakr, D., M. C. Daunay, I. Serraf, M. H. Chaput, I. Mussio, R. Haicour, L. Rossignol, and G. Ducreux. 1994. Somatic hybridization of eggplant (*Solanum melongena* L.) with its close and wild relatives, pp. 255-278. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 27. Somatic hybridization in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin.

Simmonds, N. W. and J. Smartt. 1999. Principles of of crop improvement. Blackwell Science Ltd, London, UK. 412 p.

Sink, K. C., Jr., and V. Padmanabhan. 1977. Anther and pollen culture to produce haploids: progress and application for the plant breeder. HortScience 12: 143-148.

Sink, K. C. and J. F. Reynolds. 1986. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pp. 319-344. In: Y. P. S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture in Forestry. vol. 2. Crops I. Springer-Verlag, Berlin.

Skirvin, R. M., K. D. McPheeters, and M. Norton. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. HortScience 29(11): 1232-1237.

Slater, A., N. W. Scott, and M. R. Flower. 2003. Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants. Oxford University Press, Oxford, UK. 346 p.

Smith, R. H. 2000. Plant tissue culture techniques and experiments. (2^{nd} ed.). Academic Press, San Diego, California, USA. 231 p.

Sopory, S. and M. Munshi. 1996. Anther culture, pp. 145-176. In: S. M. Jain, S. K. Sopory, and R. E. Veilleux. (eds.). *In vitro* haploid production in higher plants. Vol. 1. Fundamentals aspects and methods. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Sorvari, S., O. Toldi, K. Ahanen, T. Viinamaki, T. Hakonen, and R. Tahvonen. 1997. Using polysaccharides and galactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122(6): 878-883.

Sowokinos, J. 1994. Post-harvest regulation of sucrose accumulation in transgenic potatoes: role and properties of potato tuber UDP-Glucose pyrophosphorylase, pp. 81-106. In: W. R. Belknap, M. E. Vayda, and W. D. Park. (eds.). The molecular and cellular biology of the potato. CABI International, Wallingford, UK.

Staub, J. E., F. C. Serquen, and M. Gupta. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience 31(5): 729-741.

Stavark, S. T. and D. W. Rains. 1984. The development of tolerance to mineral stress. HortScience 19: 377-384.

Street, H. E. 1975. Plant Cell cultures: Present and projected applications for studies in genetics, pp. 231-244. In: L. Ledoux. (ed.). Genetic manipulations with plant material. Plenum Pr., N. Y.

Stuber, C. W. 1992. Biochemical and molecular markers in plant breeding. Plant Breed. Rev. 9: 37-61.

Sunderland, N. 1980. Guidlines in the culture of pollen *in vitro*, pp. 33-40. In: D. S. Ingran and J. P. Helgeson. (eds.). Tissue culture methods for plant pathologists. Blackwell Scientific Pub., Oxford.

Swarup, S. and V. Swarup. 1993. Molecular biology in plant breeding, pp. 219-254. In: J. Prakash and R. L. M. Pierik. (eds.). Plant biotechnology: commercial prospects and problems. Science Publishers, Inc., Lebanon, NH, USA.

Tabei, Y., S. Kitade, Y. Nishizawa, N. Kikuchi, T. Kayano, T. Hibi, and K. Akutsu. 1997. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). Plant Cell Reports 17(3): 159-164.

Tacke, E., F. Salamini, and W. Rohde. 1996. Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. Nature Biotechnology 14(11): 1597-1601.

Tacket, C. O. and H. S. Mason. 1999. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. Microbes and Infection. 1(10): 777-783.

Tacket, C. O., H. S. Mason, G. Losonsky, J. D. Clements, M. M. Levine, and C. J. Arntzen. 1998. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. Nature Medicine 4(5): 607-609.

Taji, A., P. Kumar, and P. Lakshmanan. 2002. In vitro plant breeding. Food Products Press, N. Y. 167 p.

Takashina, T., T. Suzuki, H. Egashira, and S. Imanishi. 1998. New molecular markers linked with the high shoot regeneration capacity of the wild tomato species *Lycopersicon chilense*. Breeding Science 48(2): 109-113.

Tal, M. 1990. Somaclonal variation for salt resistance, pp. 236-257. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 11. Somaclonal variation in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin.

Tang, F. A. and Z. K. Punja. 1989. Isolation and culture of protoplasts of *Cucumis sativus* and *Cucumis metuliferus* and methods for their fusion. Cucurbit Genetics Cooperative Report 12: 29-34.

Tenhaken, R. 2002. Transgenic plants with enhanced tolerance against microbial pathogens, pp. 549-569. In: K. M. Oksman-Caldentery and W. H. Barz. (eds.). Plant biotechnology and transgenic plants. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Tepfer, M. 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. Ann. Rev. Phytopath. 40: 467-491.

Thiele, A., M. Herold, I. Lenk, P. H. Quail, and C. Gatz. 1999. Heterologous expression of *Arabidopsis* phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. Plant Physiology 120(1): 73-81.

Thilmony, R. L., Z. T. Chen, R. A. Bressan, and G. B. Martin. 1995. Expression of the tomato Pto gene in tobacco enhances resistance to

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* expressing avrPto. Plant Cell 7(10): 1529-1536.

Thomas, B. R. and D. Pratt. 1982. Embryo callus hybrids. Calif. Agric. 36(8): 27.

Thomzik, J. E., K. Stenzel, R. Stocker, P. H. Schreier, R. Hain, and D. J. Stahl. 1997. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. Physiological and Molecular Plant Pathology 51(4): 265-278.

Thorpe, T. A. (ed.). 1981. Plant tissue culture: methods and application in agriculture. Academic Press, N. Y. 379 p.

Tieman, D. M., K. D. Kausch, D. M. Serra, and A. K. Handa. 1995. Field performance of transgenic tomato with reduced pectin methylesterase activity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120(5): 765-770.

Tisserat, B., E. B. Esan, and T. Murashige. 1979. Somatic embryogensis in angiosperms. Hort. Rev. 1-78.

Topfer, R. and N. Martini. 1998. Engineering of crop plants for industrial traits, pp. 161-181. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Towill, L. E. 2002. Cryopreservation of plant germplasm: Introduction and some observations, pp. 3-21. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 50. Cryoperservation of plant germplasm II. Springer-Verlag. Berlin.

Trigiano, R. N. and D. J. Gray. (eds.). 2005. Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida. 358 p.

Truve, E., A. Aaspollu, J. Honkanen, R. Puska, M. Metho, A. Hassl, T. H. Terri, M. Kelve, P. Seppanen, and M. Saarma. 1993. Transgenic potato plants expressing mammalian 2´-5´ oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions. Bio/Technology 11(9): 1048-1052.

Tu, H. M., L. W. Godfrey, and S. M. Sun. 1994. Expression of the Brazil nut methionine-rich protein in transgenic potato plants, pp. 209-220.

In: W. R. Belknap, M. E. Vayda, and W. D. Park. (eds.). The molecular and cellular biology of the potato. CABI International, Wallingford, UK.

Vain, P., N. Keen, J. Murillo, C. Rathus, C. Nemes, and J. J. Finer. 1993. Development of the Particle Inflow Gun. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture 33(3): 237-246.

Vasil, I. K. 1976. The progress, problems, and prospects of plant protoplast research. Adv. Agron. 28: 119-160.

Vasil, I K. (ed.). 1980. Perspective in plant cell and tissue culture. Academic Press, N. Y. 257 p.

Vasil, I. K. and V. Vasil. 1980. Isolation and culture of protoplasts, pp. 1-19. In: I. K. Vasil. (ed.). Perspective in plant cell and tissue culture. Academic Press, N. Y.

Vasil, I. K., W. R. Scowcroft, and K. J. Frey. (eds.). 1982. Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Pr., N. Y. 300 p.

Veilleux, R. E. 1994. Development of new cultivars via anther culture. HortScinece 29(11): 1238-1240.

Veilleux, R. E. and A. A. T. Johnson. 1998. Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. Plant Breed. Rev. 16: 229-268.

Veilleux, R. E., M. E. Compton, and J. A. Saunders. 2005. Use of protoplasts for plant improvement. In: R. N. Trigiano and D. J. Gray. (eds.). Plant development and biotechnology. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Waara, S. and K. Glimelius. 1995. The potential of somatic hybridization in crop breeding. Euphytica 85: 217-233.

Walden, R. 1988. Genetic transformation in plants. Open University Press, Milton Keynes. 138 p.

Wallis, J. G., W. H. Yu, and D. J. Guerra. 1997. Expression of a synthetic

antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures. Plant Molecular Biology 35(3): 323-330.

Walsh J. A. 2000. Transgenic approaches to disease resistant plants as exemplified by viruses, pp. 218-252. In: M. Dickinson and J. Beynon. (eds.). Molecular plant pathology. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Wang, P. J. and A. Charles. 1991. Micropropagation through meristem culture, pp. 32-52. In: Y. P. S. Bajaj. (ed.). Biotechnology in agriculutue and forestry, vol. 17. High-tech micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin.

Wang, J. S., T. Sakai, S. Taura, M. Sato, and T. Kokuba. 1997. Production of somatic hybrid between cultivars of sweet potato, *Impomoea batatas* (L.). Lam. in the same incompatible group. Breeding Science 47(2): 135-139.

Wang, C., C. K. Chin, and A. Chen. 1998. Expression of the yeast Ä-9 desaturase gene in tomato enhances its resistance to powdery mildew. Physiological and Molecular Plant Pathology 52(6): 371-383.

Watt, K., J. Graham, S. C. Gordon, M. Woodhead, and R. J. McNicol. 1999. Current and future transgenic control strategies to vine weevil and other insect resistance in strawberry. J. Hort. Sci. Biotech. 74(4): 409-421.

Waugh, R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. Trends in Biotechnology 10(6): 186-191.

Webb, K. E. and R. Wilson. 1991. Extraction, purification and assay of DNA, pp. 15-23. In: J. M. Grange, A. Fox, and N. L. Morgan. (eds.). Genetic Manipulation: techniques and applications. Blackwell Scientific Publications, London.

Weber, S., K. Zarhloul, and W. Friedt. 2001. Modification of oilseed quality by genetic transformation. Prog. Bot. 62: 140-174.

Weeden, N. F. 1989. Applications of isozymes in plant breeding. Plant Breed. Rev. 6: 11-54.

Wehling, P. 2000. Quality and breding: cultivars, genetic engineering, pp. 21-42. In: R. L. Shewfelt and B. Bruckner (eds.). Fruit & Vegetable quality. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pennsylvania, USA.

Wetherell, D. F. 1982. Introduction to *in vitro* propagation. Avery Publishing Group, Inc., Wayne, N. J. 87 p.

Williamson, J. D. 2002. Plant biotechnology: past, present, and future. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127(4): 462-466.

Withers, L. A. and F. Engelmann. 1998. In vitro conservation of plant genetic resources, pp. 57-88. In: A. Altman. (ed.). Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., N. Y.

Wolters, A., E. Jacobsen, M. O'Connell, G. Bonnema, K. S. Ramula, H. de Jong, H. Schoenmakers, J. Wijbrandi, and M. Koorneef. 1994. Somatic hybridization as a tool for tomato breeding. Euphytica 79: 265-277.

Woodson, W. R. 1997. Biotechnology and horticulture. HortScience 32(6): 1021-1023.

Wu, G. S., B. J. Shortt, E. B. Lawrence, E. B. Levine, K. C. Fitzsimmons, and D. M. Shah. 1995. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding $H_2O_2^{\cdot}$ generating glucose oxidase in transgenic potato plants. Plant. Cell 7(9): 1357-1368.

Young, N. D. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. Rev. Plant Phytopath. 34: 479-501.

Zeigler, R. S. 2001. Agricultural Biotechnology: reducing poverty in developing countries. Plant Disease 85(6): 568-579.

Zenkteler, M. 1980. Intraovarian and *in vitro* pollination, pp. 137-156. In: I. K. Vasil. (ed.). Perspective in plant cell and tissue culture. Academic Press, N. Y.

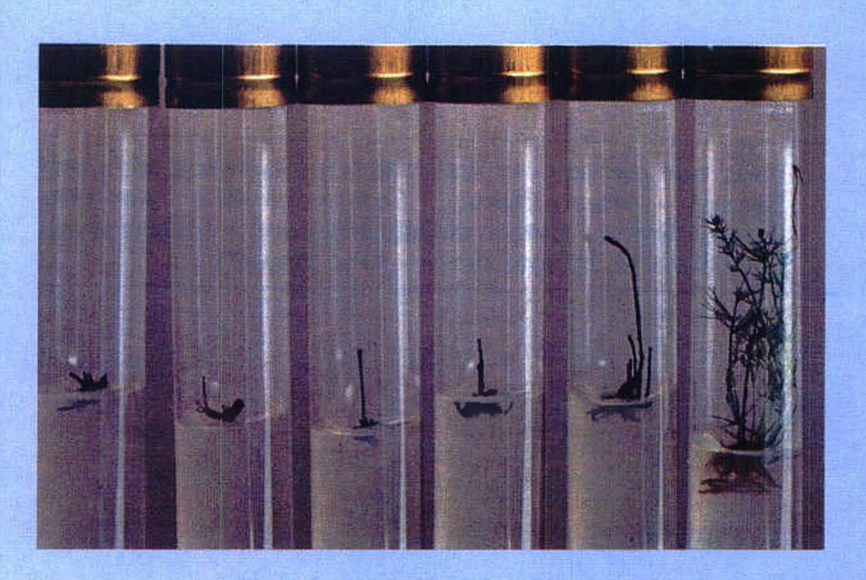
Zhang, Z., D. P. Coyne, A. K. Vidaver, and A. Mitra. 1998. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants. Phytopathology 88: 730-734.

Zhong, G. Y. 2001. Genetic issues and pitfalls in transgenic plant breeding. Euphytica 118: 137-144.

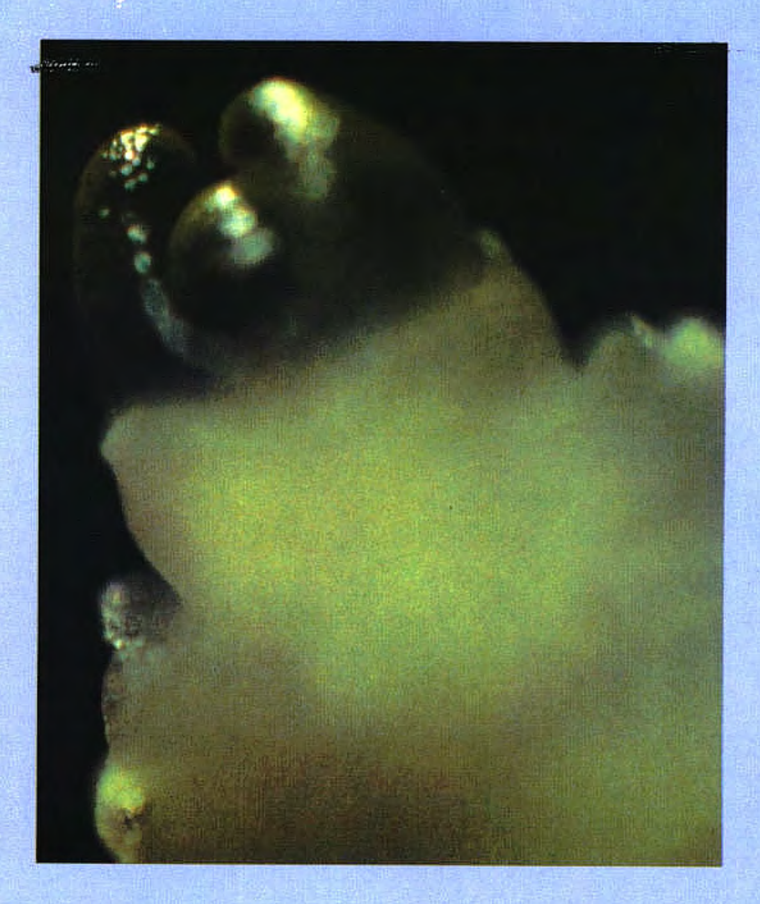
Ziauddin, A. and K. J. Kasha. 1990. Genetic stability in haploid cell cultures. In: Y. P. S. Bajaj (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 12. Haploids in crop improvement I. Springer-Verlag, Berlin.



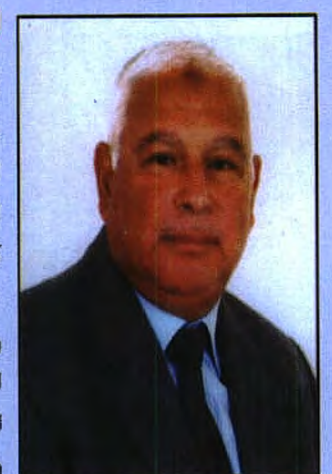
شكل (٦-١١) الإكثار الدقيق للفراولة



شكل (٦-١٢) الإكثار الدقيق للأسبرجس



شكل (٦– ١٤) القمة الخضرية النامية – بما فيها من ميرسيتم قمى وما يحيط به من مبادئ أوراق – كما تظهر تحت المجهر



المؤلف في سطور

دكتور / أحمد عبد المنعم حسن. أستاذ الخضر بكلية الزراعة – جامعة القاهرة. من مواليد محافظة البحيرة ١٩٤٢. حصل على البكالوريوس من جامعة الإسكندرية بتقدير ممتاز مع مرتبة الشرف الأولى عام ١٩٦٢، والماجستير من جامعة ولاية نورث كارولينا ١٩٦٦، والدكتوراه من جامعة كورنلّ بالولايات المتحدة ١٩٧٠. عمل بجامعات الإسكندرية، والقاهرة، وبغداد، والإمارات العربية المتحدة. أشرف على عديد من طلبة الدراسات العليا فى جامعات القاهرة، وعين شمس، وبغداد، عضو عديد من اللجان والجمعيات العلمية المحلية والعالمية. له ٤٤ مؤلفًا علميًا وأكثر من ٨٠ بحثًا علميًا منشورة فى الدوريات العلمية المحلية والعالمية. حصل على جائزة الدولة التشجيعية ووسام العلوم والفنون من الطبقة الأولى (أكاديمية البحث العلمى – مصر). والجائزة الأولى لندوة الثقافة والعلوم (دبى)، وأربع جوائز عن التأليف العلمى الزراعى (وزارة الزراعة – مصر).

* **صدرت له الكتب التالية:**

- **فى مجال إنتاج الخضر:** أساسيات إنتاج الخضر وتكنولوجيا الزراعات المكشوفة والمحمية – إنتاج محاصيل الخضر – أساسيات وفسيولوجيا الخضر – تكنولوجيا إنتاج الخضر – الأساليب الزراعية المتكاملة لمكافحة أمراض وآفات وحشائش الخضر – تكنولوجيا الزراعات المحمية.
- **فى مجال تربية النبات:** أساسيات تربية النبات – تربية محاصيل الخضر – تربية النباتات لمقاومة الأمراض والآفات – طرق تربية النبات – الأسس العامة لتربية النبات – تحسين الصفات الكمية.
- **سلسلة العلم والممارسة فى العلوم الزراعية:** تكنولوجيا الزراعات المحمية (طبعات ١٩٨٨، و ١٩٩٠) – الطماطم – البطاطس – البصل والثوم – القرعيات – الخضر الثمرية – الخضر الجذرية والورقية والزهرية – الخضر الثانوية.
- **سلسلة "العلم والممارسة لإنتاج الخضر فى الأراضى الصحراوية":** أساسيات إنتاج الخضر فى الأراضى الصحراوية – إنتاج خضر المواسم الدافئة والحارة فى الأراضى الصحراوية – إنتاج خضر المواسم المعتدلة والباردة فى الأراضى الصحراوية – إنتاج وفسيولوجيا وإعتماد بذور الخضر.
- **سلسلة "محاصيل الخضر: تكنولوجيا الإنتاج والممارسات الزراعية المتطورة":** الطماطم: تكنولوجيا الإنتاج والفسيولوجى والممارسات الزراعية والحصاد والتخزين – الطماطم: الأمراض والآفات ومكافحتها – إنتاج البطاطس – إنتاج البصل والثوم – القرعيات: تكنولوجيا الإنتاج والفسيولوجى والممارسات الزراعية والحصاد والتخزين – القرعيات: الأمراض والآفات ومكافحتها – إنتاج الفلفل والباذنجان – إنتاج الخضر البقولية – إنتاج الفراولة – إنتاج الخضر المركبة والخبازية والقلقاسية – إنتاج الخضر الخيمية والعليقية – إنتاج الخضر الكرنبية والرمرامية – إنتاج الخضر الثانوية وغير التقليدية (٣ أجزاء).
- **فى مجال الكتابة العلمية:** أصول البحث العلمى (جزآن).